Untersuchungen zur Struktur der Pyruvatdehydrogenase (EC 1. 2. 4. 1.) aus Escherichia coli K 12

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Otto Vogel

aus Spachbrücken/Hessen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0069

Untersuchungen zur Struktur der Pyruvatdehydrogenase (EC 1. 2. 4. 1.) aus Escherichia coli K 12

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Otto Vogel

aus Spachbrücken/Hessen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 5. 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Henning
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Vorwort

Für das Verständnis der Funktion von Proteinen ist die Erforschung ihrer Struktur eine Voraussetzung. Funktionsmodelle lassen sich oft schon ohne genaue Kenntnis der Struktur einzelner Komponenten mit Erfolg postulieren (z.B. das Regulationsmodell für das Lac-Operon von F. Jacob und J. Monod), doch sind sie erst durch die Strukturanalyse dieser Komponenten verifizierbar.

Die in der Arbeitsgruppe von U. Henning durchgeführten Untersuchungen zur Genetik und Regulation des Pyruvatdehydrogenasekomplexes aus E. coli ließen Kenntnisse über die Struktur der Teilkomponente "Pyruvatdehydrogenase" wünschenswert erscheinen, da genetische Daten und solche aus Regulationsstudien für die Beteiligung dieses Enzyms an der Regulation des Gesamtkomplexes sprechen. Mit diesen Strukturuntersuchungen befaßt sich die vorliegende Dissertation.

Herrn Prof. Dr. U. Henning bin ich für die Überlassung des Themas, für sein andauerndes Interesse und die Bereitschaft, jederzeit auf meine Probleme einzugehen, zu besonderem Dank verpflichtet. Den Herren Dr. V. Braun, Dr. K. Rehn und Dr. U. Schwarz danke ich für viele Diskussionen und methodische Hinweise. Herrn Prof. Dr. H.-G. Wittmann und Herrn Dr. E. Kaltschmidt, MPI für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, danke ich für Unterweisung in der Technik der präparativen Polyacrylamidelektrophorese und die Überlassung der Konstruktionszeichnungen des von ihnen entwickelten Elektrophoresegerätes.

Mein Dank gilt auch Herrn H. Reimuth für die Anfertigung der Geräte für analytische und präparative Polyacrylamidelektrophorese, Herrn U. Rudolf für wertvolle Ratschläge bei der Durchführung der Ultrazentrifugenversuche, Herrn R. Marek für tatkräftige Hilfe bei einigen Enzympräparationen, sowie Herrn E. Freiberg für die Ausführung der Zeichnungen und Tabellen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für finanzielle Unterstützung, der Max-Planck-Gesellschaft für ein zweijähriges Promotionsstipendium zu Dank verpflichtet.

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Biochemische Grundlagen	1
1.2	Genetische Grundlagen	3
1.3	Regulationsmodelle und Fragestellung	5
2.	Material und Methoden	7
2.1	Herkunft der Zellen und Chemikalien; Tests	7
2.2	Isolierung des PDHK	8
	2.21 Aufschluß in Aluminiumoxid	8
	2.22 Protaminsulfatfällung	8
	2.23 Säurefällung	9
	2.24 Fraktionierung auf Ca-Phosphatgel-Zellulose	10
	2.25 Zentrifugation bei 100 000xg	11
2.3	Abtrennung der PDH vom PDHK	12
2.4	Umsetzungen der PDH	13
2.5	Polyacrylamidgel-Elektrophoreseverfahren	13
2.6	Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge	15
2.61	Molekulargewichtsbestimmungen auf Biogel	19
2.7	Aminosäurenanalysen	19
2.8	Tryptischer Abbau	20
2.91	Untersuchungen über COOH-terminale Aminosäuren	21
2.92	Untersuchungen über NH_2-terminale Aminosäuren	23
	2.921 Carbamylierung	23
	2.922 Dansylierung	23
	2.923 Leucinaminopeptidase-Abbau	24

3. Ergebnisse 24

3.1 Reinigung des PDHK und Abtrennung der PDH 24

3.2 Carboxymethylierung und Oxydation der PDH 38

3.3 Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge 40

3.31 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von "gealterter" PDH 40

3.32 Molekulargewichtsbestimmungen in 6 M Guanidinium HCl bei pH 5.9, 2.0 und 7.4 43

3.33 Molekulargewichtsbestimmung in 0.05 n NaOH 48

3.4 Molekulargewichtsbestimmung auf Biogel 50

3.5 Aminosäurenzusammensetzung 53

3.51 Partielles spezifisches Volumen (V) 55

3.6 Tryptischer Abbau 55

3.7 Bestimmung der terminalen Aminosäuren 58

3.71 COOH-terminale Studien 58

3.72 NH_2-terminale Studien 60

3.721 Carbamylierung nach Stark und Smyth 60

3.722 Dansylierung nach Gray 61

3.723 Leucinaminopeptidase-Abbau 61

3.8 Ergänzende Trennungsversuche 64

4. Diskussion 67

5. Zusammenfassung 71

6. Literaturverzeichnis 73

7. Abkürzungen 77

1. Einleitung

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHK)[+)] in Escherichia coli katalysiert eine der zentralen Reaktionen des Bakterienstoffwechsels, die Umsetzung des Pyruvats zu Acetyl CoA (15):

$$CH_3COCOO^- + CoA\sim SH + NAD^+ \rightarrow CH_3CO\sim SCoA + NADH + H^+ + CO_2,$$

zentral deshalb, weil das Produkt dieser Reaktion, die "aktivierte" Essigsäure für Energiestoffwechsel und Syntheseleistungen der Zelle gleichermaßen bedeutend ist.

1.1 Biochemische Grundlagen

Der Abbau des Pyruvat zu Acetyl CoA vollzieht sich an drei distinkten Enzymen (32) unter Beteiligung von Mg^{2+}, TPP, CoA~SH, Liponsäure, FAD und NAD^+ als Cofaktoren in einer komplexen Reaktion, die sich in fünf Schritte zerlegen läßt (15,41):

(1) $CH_3COCOO^- + PDH\cdot TPP \xrightarrow{Mg^{2+}} PDH\cdot TPP - CHOH\cdot CH_3 + CO_2$

(2) $PDH\cdot TPP\text{-}CHOH\cdot CH_3 + LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(S\text{-}S) \rightarrow PDH\cdot TPP + LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(CH_3COS)(SH)$

(3) $LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(CH_3COS)(SH) + CoA\sim SH \rightarrow LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(HS)(SH) + CH_3CO\sim SCoA$

(4) $LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(HS)(SH) + LDH\cdot FAD_{ox} \rightarrow LAT\cdot NHCO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH(S\text{-}S) + LDH\cdot FAD_{red}$

(5) $LDH\cdot FAD_{red} + NAD^+ \rightarrow LDH\cdot FAD_{ox} + NADH + H^+$

Die Zwischenprodukte der Teilreaktionen sind enzymgebunden. Detaillierte Untersuchungen über Zwischenprodukte und die Wirkungsmechanismen der Cofaktoren am PDHK oder analogen Enzymen liegen vor (11,24,34,36,42,46-48), sie sollen hier nicht weiter diskutiert werden.

+) Abkürzungen siehe unter 7

Die Zerlegung des PDHK in seine drei Bestandteile wurde von Koike et al. (32) durchgeführt. Auf einer Calciumphosphatgel-Zellulose-Säule läßt sich bei pH > 9 eine Enzymfraktion vom Komplex abtrennen, die die Modellreaktion (16)

$$CH_3COCOOH + 2Fe(CN)_6^{3-} + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2Fe(CN)_6^{4-} + CO_2 + 2H^+$$

katalysiert, somit die Funktion einer Pyruvat(-Decarboxylase)-Dehydrogenase (PDH ≙ EC 1.2.4.1.) ausübt (siehe Teilreaktionen (1) und (2)).

Ebenfalls auf Calciumphosphatgel-Zellulose und in Gegenwart von 4 M Harnstoff kann der Restkomplex (RK) in zwei weitere Enzymkomponenten gespalten werden, eine Liponsäure-Acetyltransferase (EC 2.3.1.12; siehe Teilreaktionen (2) bis (4)) und eine FAD-haltige Lipoamid-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3; siehe Teilreaktionen (4) und (5)).

Die Molekulargewichte der Komponenten wurden zu 183 000 für die PDH (32), zu 1 090 000 für die LAT (17) und zu 112 000 für die LDH (32) bestimmt. Die Teilkomponenten assoziieren in wässriger Lösung spontan und liefern den voll aktiven Enzymkomplex. Die Mengenanteile der einzelnen Enzyme am Gesamtkomplex wurden mit ca. 50% für die PDH, ca. 34% für die LAT und ca. 16% für die LDH angegeben (32). Bei einem Molekulargewicht von 3.6×10^6 für den PDHK (32) entsprechen diese Anteile einem ungefähren Molekülverhältnis von 12:1:6 und einer Zuordnung der Cofaktoren von 24 kovalent gebundenen Liponsäuremolekülen/Molekül LAT (17) bzw. 2 FAD/Molekül LDH (32).

Zahlreiche physikalisch-chemische Daten liegen über die Struktur der LAT und ihre Untereinheiten vor (17,49,63): das Enzym dissozi-

iert in 0.83 M Essigsäure reversibel in enzymatisch inaktive Dimere mit einem Molekulargewicht von ca. 70 000 und nach Carboxymethylierung in 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.0, in identische Monomere mit einem Molekulargewicht von ca. 39 000. Aminosäurenzusammensetzung, terminale Aminosäuren und Peptidmuster der Polypeptidkette nach tryptischem Abbau sind bekannt.

Experimentelle Angaben über die Substruktur der PDH wurden bisher nicht veröffentlicht. Reed (43,44) hält eine Zusammensetzung des Moleküls aus nichtidentischen Ketten ($\alpha\beta$) mit einem Molekulargewicht des Monomeren von ca. 45 000 für gegeben. Als C-terminale Aminosäuren wurden Ala und Leu, als N-terminale Aminosäuren (in geringen Ausbeuten) Ser und Ala bestimmt (44).

1.2 Genetische Grundlagen (cf. 20)

Die Strukturgene für die Enzyme PDH und LAT auf dem Chromosom von E. coli wurden zwischen dem Leu- und T1,5^{R}-Locus kartiert und bilden den Acetat-Locus (ace)(19); sie werden in Richtung PDH, LAT $\rightarrow$ transkribiert und transferiert (22). Die Lage des Gens für die LDH konnte bisher nicht bestimmt werden. Wahrscheinlich beruht die Unauffindbarkeit des Genorts für die LDH auf der funktionellen Austauschbarkeit der Flavoproteine des PDHK und des α-Ketoglutarsäure-Dehydrogenasekomplexes in E. coli (38), wodurch eine Mutation im Gen der LDH des PDHK mindestens teilweise durch das Flavoprotein des α-Ketoglutarsäure-Dehydrogenasekomplexes kompensiert werden könnte. Falls beide Flavoproteine auch genetisch identisch sind, würde bei Ausfall des Gens ein Bedürfnis für Acetat und Succinat entstehen. Allerdings ließen sich bisher auch solche Mutanten nicht finden (22).

Mutationen in den Genen der PDH und LAT, die Verlust der PDHK-Aktivität zur Folge haben, bedingen Auxotrophie für Acetat. Im PDH-Gen sind zahlreiche pleiotrope Mutationen bekannt, die zum Teil weder PDH noch LAT in enzymatisch oder immunologisch meßbaren Mengen produzieren (Mutanten vom sog. 0°-Typ), oder LAT in stark herabgesetzten Mengen synthetisieren. Die Mutationsorte dieser Mutanten ließen sich ausnahmslos dem PDH-Gen zuordnen. Besonders bemerkenswert ist die ungewöhnlich große Häufigkeit dieser 0°-Typ-Mutanten; fast 30% aller bisher isolierten ace-Auxotrophen (mehr als 100 wurden isoliert) sind von diesem Typ (20,22).

Die enge Kopplung der Gene für PDH und LAT sowie das Vorkommen von pleiotropen und 0°-Mutanten legen die Hypothese einer gemeinsamen Regulation dieser Gene nahe, möglicherweise unter Einschluß des Gens für die LDH, da Mutationen im Gen der LAT mit polarem Effekt auf die Synthese der LDH gefunden wurden. Da die Enzymkomponenten im Komplex im stöchiometrischen Verhältnis von 12:1:6 bzw. als Monomere im Verhältnis von (24 + 24):24:12 vorliegen sollen (43) und zudem keine "freien" Komponenten des Komplexes in Zellextrakten nachweisbar sind (19), erscheint auch unter diesem Aspekt eine koordinierte Biosynthese in Form gemeinsamer Regulation zumindest der Enzyme PDH und LAT gegeben.

Pyruvat konnte als interner Induktor der PDHK-Synthese charakterisiert und seine Funktion als induzierender Effektor wahrscheinlich gemacht werden (21), allerdings blieben Versuche, ein Regulatorgen zu identifizieren, erfolglos: für konstitutive Mutanten war nach der Art der Induktionswirkung des Pyruvats keine

Selektion möglich, Mutanten vom i^S-Typ (64) wurden nicht gefunden, ebenso keine "Aktivatorgen"-Mutanten.

1.3 Regulationsmodelle und Fragestellung

Diese Gegebenheiten führten im Zusammenhang mit den genannten Eigenschaften der O^C-Mutanten und ersten Anhaltspunkte über die Substruktur der PDH (20) zur Annahme eines spezifischen Regulationsmechanismus für den PDHK in der Richtung, daß ein Teil der PDH oder das gesamte Proteinmolekül für die Induktion der übrigen PDHK-Genprodukte erforderlich sei.

Die Mitwirkung der PDH am Induktionsvorgang ist wahrscheinlich nicht enzymatischer Natur derart, daß sie - analog zur β-Galactosidase im Lac-System (3) - den Induktor, d.h. Pyruvat, erst zum eigentlichen Effektor umwandelte; (Induktion des PDHK durch Pyruvat ist mit gleicher Wirksamkeit in Abwesenheit von TPP, dem Coenzym des ersten Reaktionsschrittes, möglich). Die PDH oder eine Teilkomponente scheint als "Zielscheibe" für den Effektor zu fungieren - analog dem C-Genprodukt im Arabinose-System (10) -, wobei dann der Protein-Effektor-Komplex die Synthese des PDHK regulieren würde.

Vergleichbare Mechanismen der Beteiligung von Strukturgenprodukten an der Regulation von biosynthetisch assoziierten Genprodukten können für mehrere Systeme als wahrscheinlich gelten oder wurden nachgewiesen, so für die Phosphoribosyl-ATP-Phosphorylase an der Regulation des His-Biosynthesewegs (12), für die Anthranilat-Synthetase an der Regulation des Try-Biosynthesewegs (52); bei den RNS-Phagen f2 und MS2 ist das Hüllprotein an der Regulation der Synthese der frühen Enzyme beteiligt (35,56). Für das

Verständnis des bei der Synthese des PDHK wirksamen Regulationsmechanismus schien die Kenntnis der PDH-Substruktur in zweierlei Hinsicht wichtig: (1) bot sie eine Orientierung bei allen anderen Untersuchungen zur Regulation des PDHK (z.B. Interpretation regulatorischer Mutanten, Bindungsexperimente mit Pyruvat, Versuche mit diploiden Stämmen u.a.), (2) versprach sie die Charakterisierung der regulierenden Proteinkomponente und eine genaue Zuordnung von Effektor und Regulatorgenprodukt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Zusammensetzung der PDH aus Polypeptidketten aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Der PDHK wurde aus E. coli K12-Zellen isoliert, die als tiefgefrorene Paste bei Grain Processing Corp., Muscatine, U.S.A. gekauft waren. Die Zellen waren in angereichertem Medium mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle gezüchtet und in der späten log-Phase geerntet. Verschiedene Lose von Zellen wurden aufgearbeitet, die sich in der Menge und im Verhalten des PDHK während der Aufarbeitung etwas unterschieden; dies mag auf nicht streng konstante Wachstumsbedingungen und Erntezeiten zurückzuführen sein.

Die Chemikalien, sofern bei den einzelnen Methoden nicht gesondert aufgeführt, waren p.a.-Erzeugnisse der Firmen E. Merck, Darmstadt, und Riedel de Haen, Hannover. Für alle Versuche wurde deionisiertes Wasser verwandt.

Die Aktivität des PDHK wurde nach dem Pyruvat-Dismutationstest in µMol Acetylphosphat/h bei 30°C und pH 7.0 (40) gemessen, die der PDH nach Komplementation mit Restkomplex in gleicher Weise (18); als spezifische Aktivität wurde die Enzymaktivität/mg Protein angegeben.

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Mikrobiuret-Methode von Itzhaki und Gill (25) mit einem optimalen Anwendungsbereich zwischen 0.01 und 0.5 mg Protein/ml. Proteinbestimmung nach Warburg et al. (62) führte beim PDHK und der PDH zu um 35% zu hohen, beim RK zu um 30% zu niedrigen Werten; diese Methode wurde daher nur zur Bestimmung relativer Vergleichswerte herangezogen.

Alle pH-Werte wurden mittels Glaselektrode bei Raumtemperatur bestimmt (pH-Meter 25, Radiometer Copenhagen).

2.2 Isolierung des PDHK

Das von Koike et al. (32) zur Anreicherung des PDHK angegebene Verfahren erwies sich für die Gewinnung größerer Enzymmengen als zu langwierig. Folgende Modifikationen wurden entwickelt, die große Ansätze in einem verkürzten Arbeitsprozess aufzuarbeiten erlauben:

2.21 Zellaufschluß mit Aluminiumoxid: Die halb aufgetaute Zellpaste (ca. 1400-1800 g) wurde mit doppelter Gewichtsmenge Al_2O_3 (Bacteriological Grade Alumina A-305, Aluminum Company of America) in einer Retsch-Mühle KM 1 bei $4^{\circ}C$ 20 min. zerrieben, das Homogenat anschließend mit 1/3 Volumen 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (KPP), pH 7.0, 10^{-3} M an L-Cystein verdünnt und nach Zugabe von 1 g/ml Pancreas-DNase (rein, lyoph., SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg) über Nacht bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt.
Diese DNase-Behandlung des Zellhomogenats nach Al_2O_3-Aufschluß erwies sich im Hinblick auf die nachfolgende Protaminsulfatfällung als notwendig; andererseits mag sie für die Nichtreproduzierbarkeit der Protaminsulfatfällung (s. unten) mitverantwortlich sein.
Das dünnflüssige Homogenat wurde 90 min. bei 40 000xg in einer Spinco-Zentrifuge Modell L zentrifugiert, der Rückstand zweimal mit der gleichen Puffermenge wie oben gewaschen und die Überstände vereinigt.

2.22 Protaminsulfatfällung: Es war nicht möglich, in Extrakten aus gekauften Zellen die Protaminsulfatfällung zu standardisieren; auf die wahrscheinlichen Ursachen wurde bereits hingewiesen. Optimale Bedingungen für die Protaminsulfatfällung wurden jeweils in Vorversuchen ermittelt.

Zur Fällung wurde der Rohextrakt mit 1 M Essigsäure auf pH 5.8 eingestellt und auf 44 mg Protein/ml verdünnt; gefällt wurde mit einer 4.4%igen wässrigen Protaminsulfatlösung (Salmiridinsulfat, Hormonchemie, München), die ebenfalls mit 1 M Essigsäure auf pH 5.0 gebracht war.

In einer ersten Fällung mit 25-38 Vol% Protaminsulfatlösung (je nach Vorversuch) wurde vorwiegend Nucleinsäure mit Fremdproteinen entfernt, nach der zweiten Fällung mit 6-10 Vol% Protaminsulfatlösung (je nach Vorversuch) befand sich neben Verunreinigungen (ca. 50%) die Hauptmenge des PDHK im Niederschlag; der PDHK ließ sich mit ca. 20-30 ml 0.1 M KPP,pH 7.5, 10^{-2} M an L-Cystein fast vollständig aus dem Präzipitat eluieren.

2.23 Säurefällung: Aus der angereicherten Enzymfraktion wurde der PDHK mit 1 M Essigsäure erneut gefällt, er präzipitierte gewöhnlich zwischen pH 6.0 und pH 5.3; der zitronengelbe Niederschlag wurde in 0.1 M KPP,pH 7.5,gelöst.

Bei späteren Enzympräparationen wurde auf eine Säurefällung verzichtet, da die Fällbarkeit des PDHK mit 1 M Essigsäure stark von der Qualität der Protaminsulfatfällung, d.h. von der bei diesem Schritt erzielten Anreicherung abhängig war; in mehreren Fällen präzipitierte der Komplex auch bei sehr niederen pH-Werten (< pH 4) nicht. Außerdem waren bei der Säurefällung größere Aktivitätsverluste unvermeidbar, die teilweise den Anreicherungseffekt überwogen. Eine bessere Anreicherung bei vernachlässigbaren Verlusten konnte mit den nachfolgenden Verfahren erzielt werden.

2.24 Reinigung auf Calcium-Phosphatgel-Zellulose: Die Herstellung des Calcium-Phosphat-Gel erfolgte nach der Methode von Swingle und Tiselius (58).

Zur weiteren Fraktionierung der angereicherten Enzymlösung wurden Säulen von 4.0 cm und 6.5 cm Durchmesser verwandt mit eingeschmolzenen G3-Glasfritten, auf die das Gel-Zellulose-Gemisch geschichtet werden konnte (optimale Füllhöhe 8-10 cm). Zur Füllung wurden 2 Anteile Calcium-Phosphatgel (30 mg Tr.Gew./ml) und 3 Anteile 10% Zellulose-Suspension (Whatman Fibrous Cellulose Powder CF 11, bezogen von Hormuth-Vetter, Heidelberg) gemischt und im Vakuum gut entlüftet; ca. 500 ml dieses Gemisches erwiesen sich zur Adsorption von ca. 200 mg PDHK als ausreichend.

Da bei größeren Füllvolumina während der Sedimentation der Partikel eine teilweise Entmischung der Komponenten stattfindet, was zu stark verringerter Durchflußgeschwindigkeit und unregelmäßiger Fraktionierung führt, wurde die Füllung in 1/10-Anteilen des Gesamtvolumens in die Säule gegeben, d.h. jede nachfolgende Teilmenge erst nach vollständiger Sedimentation der Partikel der vorhergehenden eingefüllt; die dadurch entstehenden Schichten hatten eine Höhe von ca. 1 cm.

Die mit 0.1 M KPP,pH 7.5,äquilibrierte Calciumphosphatgel-Zellulose-Säule adsorbiert eine durch Protaminsulfat-Fällung angereicherte PDHK-Fraktion vollständig, während der überwiegende Anteil noch vorhandener Verunreinigungen die Säule passiert (s. Abb. 1, Bande A).

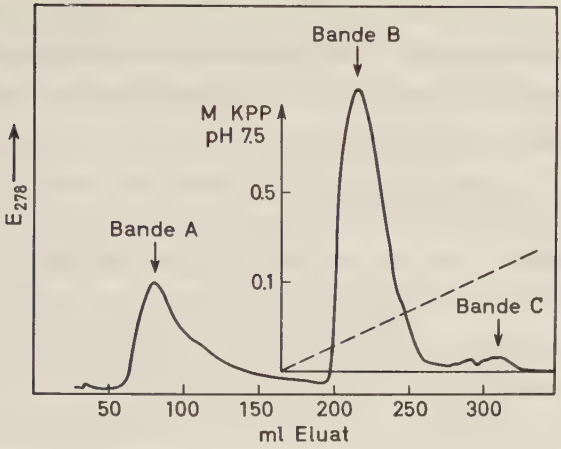


Abb. 1: Das für den Reinigungsschritt auf einer Calciumphosphatgel-Zellulose-Säule typische Elutionsdiagramm zeigte drei Banden
(A) Verunreinigungen, die die Säule bei 0.1 M KPP, pH 7.5, passieren,
(B) die PDHK-Bande wird zwischen 0.125 M und 0.25 M KPP, pH 7.5, eluiert,
(C) stark fluoreszierende proteinarme Bande bei 0.3 M KPP, pH 7.5, eluiert.

Der PDHK kann dann entweder mit 0.3 M KPP, pH 7.5, oder einem linearen Puffergradienten 0.1 M → 0.5 M KPP, pH 7.5, als gelbe, stark fluoreszierende Bande von der Säule eluiert werden (s. Abb. 1, Bande B). Dicht auf die PDHK-Bande folgt eine weitere gelbe, stark fluoreszierende Bande mit nur geringem Proteingehalt (s. Abb. 1, Bande C).

2.25 Das PDHK-Eluat wurde 2 Stunden bei 100 000xg zentrifugiert und das Sediment in wenig 0.1 M KPP, pH 7.5, gelöst; der PDHK ist sehr gut löslich (> 6%) und in hoher Konzentration bei -60°C mehrere Monate ohne merklichen Aktivitätsverlust haltbar.

Durch die Zentrifugation werden niedermolekulare Verunreinigungen quantitativ entfernt. Daher wurde ein Zentrifugationsschritt bei einigen Präparationen auch vor der Reinigung auf Calciumphosphatgel-Zellulose eingeschoben.

2.3 Abtrennung der PDH vom PDHK

Die Abtrennung der PDH vom PDHK erfolgte weitgehend nach der von Koike et al. (32) beschriebenen Methode. Die Calciumphosphatgel-Zellulose-Säule wurde, wie beschrieben, präpariert und mit 0.05 M Äthanolaminphosphat-Puffer,pH 9.5 (0.02 M an Äthanolamin, 0.025 M an KPP) äquilibriert. Der PDHK wurde sehr konzentriert (ca. 50 mg Protein/ml) in 0.1 M KPP,pH 7.5,auf die Säule aufgegeben, die PDH mit 0.05 M Äthanolaminphosphat-Puffer,pH 9.5,und der adsorbierte RK mit 0.5 M KPP,pH 7.5,eluiert (s. Abb. 4 + 6). Bei den ersten Präparationen war der PDHK vor der Trennung mit 0.5 n KOH auf 9.5 eingestellt und 1/2 h bei 4°C inkubiert worden. Die Abtrennung der PDH vom PDHK ist jedoch ohne Vorinkubation vollständiger und wahrscheinlich schonender; es verbleiben dann in der RK-Fraktion nur 1-2% der ursprünglichen PDHK-Aktivität gegenüber 5-10% nach Vorinkubation.

Die PDH wurde direkt im Eluat durch Zugabe von 50% (W/V) festem Ammonsulfat gefällt und das Präzipitat in 0.1 M KPP,pH 7.5,erneut gelöst; das Eluat des RK wurde 3 h bei 100 000 xg zentrifugiert, das gelbe Sediment in 0.1 M KPP,pH 7.5,gelöst. Beide Komponenten wurden bei -60°C aufbewahrt, nach ca. 3 Monaten war ein Aktivitätsverlust von 20-30% feststellbar.

2.4 Umsetzungen der PDH

Das gereinigte Protein wurde einerseits reduziert und carboxymethyliert, andererseits oxydiert. Reduktion und Carboxymethylierung erfolgten nach Craven et al. (13), die Oxydation in Perameisensäure wurde nach Hirs (23) durchgeführt, wobei eine Oxydationszeit von 3 Stunden sich als ausreichend erwies (s. auch Aminosäurenanalysen).

2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Verfahren

Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurden in Anlehnung an Ornstein und Davis (39) in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt.

Die Gellösungen wurden um 10% konzentrierter angesetzt und vor der Polymerisation durch Zugabe von 1/10 Volumen 0.004%iger Riboflavinlösung (Startgel) bzw. 1/10 Volumen 0.3%iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (Trenngel) auf die Endkonzentration gebracht; die Polymerisation des Startgels wurde durch das Licht einer Osram-L-Lampe induziert, die des Trenngels erfolgte spontan nach 5-30 min. je nach Gelkonzentration und pH-Wert der Lösung. Alle Lösungen waren vor dem Zusammenmischen gut entlüftet.

Folgende Gel-Puffersysteme fanden Verwendung:

1) Citrat-System:
kein Startgel;
Trenngel: 7.5% Acrylamid (a) puriss., Fluka AG, Buchs SG, Schweiz; umkristallisiert in Chloroform; b) Eastman Kodak, Rochester U.S.A.),
0.4% Bis (= N,N'-Methylenbisacrylamid; Herkünfte wie bei Acrylamid),
1% (V/V) TEMED (= Tetramethyläthylendiamin; SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg),
8 M Harnstoff (reinst, Merck AG, Darmstadt),
0.033 M Na-Citratpuffer, pH 3.0;
Anodenpuffer: 0.0025 M Na-Citratpuffer, pH 3.0 mit 0.192 M Glycin, 8 M Harnstoff;
Kathodenpuffer: 0.0025 M Citratpuffer, pH 3.0, 0.192 M Glycin.

2) Acetat-System (26):
Startgel: 2.5% Acrylamid,
0.13% Bis,
0.6% (V/V) TEMED,
8 M Harnstoff,
0.06 M Essigsäure, 0.006 M KOH, pH 4.2 eingestellt;
Trenngel: 15% (teilweise 12%) Acrylamid,
0.4% Bis,
0.6% (V/V) TEMED,
6 M Harnstoff,
4.0 M Essigsäure, 0.24 M KOH, pH 4.8 eingestellt;
Anodenpuffer: 0.048 M Essigsäure, 0.375 M Glycin, 6 M Harnstoff, pH 4.8 eingestellt;
Kathodenpuffer: 0.048 M Essigsäure, 0.375 M Glycin, pH 4.8 eingestellt.

3) Tris HCl-System:
Startgel: 2% Acrylamid,
0.5% Bis,
0.09% (V/V) TEMED,
0.083 M Tris (= Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan; a) krist., C.F. Boehringer u. Söhne GmbH, Mannheim; rekristallisiert in Methanol; b) Trizma Base, reagent grade, Sigma Chemical Company, St.Louis, USA);
Trenngel: 3 - 15% Acrylamid,
0.4% Bis,
0.058% (V/V) TEMED,
0.145 M Tris;
Elektrophoresepuffer: 0.0124 M Tris, 0.192 M Glycin. Das System wurde ohne und mit Harnstoff (6-8 M) verwandt, die jeweils erforderlichen pH-Werte (pH 6.0-9.05) mit 5.7 M HCl eingestellt.

4) Tris-Borsäure-System:
Startgel und Trenngel wie in 3) außer:
Trenngel 0.3 M an Tris;
Elektrophoresepuffer: 0.0083 M Tris, 0.065 M Borsäure, 6 M Harnstoff, pH 9.0 - 9.5.

Weitere Modifikationen s. Ergebnisse.

Die Elektrophoresen wurden in einem Gerät durchgeführt, das, abgesehen von einigen Verbesserungen, dem von der Firma Canalco Instruments, Bethesda, U.S.A., hergestellten entspricht; meistens wurde bei konstanter Stromstärke (2-4 mA/Gelsäule), in wenigen Fällen bei konstanter Spannung (120-200 Volt) elektrophoriert; die Laufzeiten variierten nach Gelkonzentration und Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinfraktionen zwischen 2 und 16 Stunden; im pH-Bereich >6 wurde Bromphenolblau, im pH-Bereich <6 Pyronin G zur Markierung der Front benutzt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Säulen mit Anilinschwarz, in einigen Versuchen auch mit Coomassie Brillant Blue nach der Methode von Crambach et al. (5) angefärbt, die Ergebnisse waren übereinstimmend. Nach Entfärbung des Gels in 2% Essigsäure wurden die Säulen in Wasser gelegt und auf Agfa-Agepe-Film aufgenommen.
Polyacrylamidgel-Elektrophoresen im präparativen Maßstab wurden in dem von Kaltschmidt et al. (26) entwickelten Gerät durchgeführt (s. auch unter "Ergebnisse").

2.6 Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge

Bestimmungen von Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichten wurden in einer Spinco-Ultrazentrifuge Modell E mit automatischer Temperaturkontrolle bei 20°C durchgeführt. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von PDH in Gegenwart von 0.1 M 2-Mercaptoaethanol wurde ein AnA-Rotor, in allen übrigen Versuchen ein AnD-Rotor benützt. Die Art der Zellmittelstücke und die eingestellten Geschwindigkeiten sind bei den Ergebnissen angegeben (s. unten); alle Zellen waren mit Saphir-Fenstern ausgestattet; die Schlierendiagramme wurden auf Agfa-Gevaert-Platten aufgenommen und unter einem Leitz-Mikrokomparator (Meßgenauigkeit: 1 µ) ausgemessen.
Die Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten erfolgte auf der Basis der Svedberg-Gleichung für den Sedimentationskoeffizienten (57)

$$(Sc)_{app} = \frac{dr/dt}{r\omega^2}$$

und unter Berücksichtigung von Druck- und Verdünnungseffekt durch graphische Extrapolation der Meßwerte auf den Ort des Meniskus

nach der Formel (7)

$$(Sc)_{app} = Sc \left(1 + const. \left(1 - r_m^2 / r_t^2\right)\right),$$

wobei $(Sc)_{app}$ den scheinbaren, Sc den wahren Sedimentationskoeffizienten bei der vorgegebenen Proteinkonzentration, r_m den Abstand des Meniscus, r_t den Abstand des Maximums der Gradientenkurve zum Zeitpunkt t vom Rotationszentrum bedeutet.

Molekulargewichtsbestimmungen wurden in folgenden wässrigen Lösungsmitteln durchgeführt:

a) 0.02 M Tris, 0.01 M NaCl, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol (SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg), eingestellt auf pH 7.4; anschließend Zugabe von 6 M Guanidinium·HCl (Guanidinium·HCl, puriss., bezogen von Fluka AG, Schweiz; rekrist. in Methanol) nach den Angaben von Ullmann et al. (60), was den pH-Wert auf pH 5.9 erniedrigte;

b) gleicher Puffer wie a), aber nach Zugabe von 6 M Guanidinium·HCl auf pH 7.4 eingestellt;

c) 6 M Guanidinium·HCl-Lösung, 0.1 M an NaCl, 0.1 M an 2-Mercaptoaethanol mit 5.7 n HCl auf pH 2.0 eingestellt. Das native Protein wurde (a) 10 Stunden gegen das 100-fache Volumen obiger Lösung pH 7.1, anschließend (b) 5 Stunden entsprechend gegen pH 3.2, (c) abschließend 9 Stunden entsprechend gegen pH 2.0 intensiv dialysiert (Puffer im Abstand von (a) 2 Stunden, (b) 2 Stunden, (c) 5 Stunden gewechselt, der Dialyseschlauch wurde in rascher Rotation gehalten); der anfänglich neutrale pH-Wert war notwendig, um vollständige Reduktion durch 2-Mercaptoaethanol herbeizuführen;

d) 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.5.

Alle Molekulargewichte wurden nach der Sedimentationsgleichgewichtsmethode bei geringen Winkelgeschwindigkeiten von Yphantis (65) ermittelt. Die Verwendung eines Sechskanal-Mittelstücks nach Yphantis (66) erlaubte gleichzeitige Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte (M_{app}) für verschiedene Proteinkonzentrationen; bei einer Füllhöhe von nur 1.8-1.9 mm war das Gleichgewicht nach 15-18 Stunden (außer in 0.05 n NaOH, s. "Ergebnisse") erreicht, die photographischen Aufnahmen wurden nach 20 Stunden oder später gemacht. Ihre Auswertung erfolgte graphisch nach der Arbeitsgleichung:

$$M_{app} = \frac{R \times T \times m_x E}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \times \frac{h}{c_o \times x_h} ,$$

wobei h gleich der Höhe der Flächenhalbierenden unter der Gradientenkurve, x_h gleich dem Abstand des Fußpunktes der Flächenhalbierenden vom Rotationszentrum und c_o gleich der Proteinkonzentration in der Zelle zum Zeitpunkt 0 ist. Das Molekulargewichtsmittel bei unendlicher Verdünnung ergab sich aus der Extrapolation der M_{app}-Werte nach c = 0.

Die Proteinkonzentrationen wurden in Überschichtungsversuchen als Flächen unter den Gradientenkurven gemessen.

Fehlerabschätzung zur Molekulargewichtsbestimmung von PDH in 6 M Guanidinium·HCl bei pH 2.0:

Meßgröße	Fehlergenauigkeit
Temperatur T:	automatisch reguliert; Fehler < 0.1%
Winkelgeschwindigkeit ω^2:	Bei Sedimentationsgleichgewichtsläufen sind momentane Schwankungen durch Beschleunigung oder Bremsung des Rotors ohne Einfluß auf das eingestellte Gleichgewicht; Fehler vernachlässigbar.

Vergrößerung $m_x E$:	Der Fehler bei 20-facher Vergrößerung kann auf < ± 0.1 cm reduziert werden, d.h. < 0.3%.
Konzentrationsbestimmung c_o:	Die graphische Bestimmung der Konzentration als Fläche unter der Gradientenkurve ist bei einem Schlierenmittel von 70° aufgrund von Erfahrungswerten mit einer Genauigkeit von ± 2% möglich.
Höhe der Flächenhalbierenden h:	ablesbar mit einer Genauigkeit von 3%.
Abstand der Flächenhalbierenden vom RZ x_h :	ablesbar mit einer Genauigkeit von 1% bei einer Proteinkonzentration von 1.5 mg/ml.
Dichte des Lösungsmittels ρ :	Tabellenwert mit möglicher Abweichung: 1.144 ± 0.002, d.h. ± 0.2%.
Partielles spezifisches Volumen $^*V$:	Da das partielle spezifische Volumen nach der Formel $$^*V = \frac{\sum MW_{AS_n} \cdot Menge_{AS_n} \cdot V_{AS_n}}{\sum MW_{AS_n} \cdot Menge_{AS_n}}$$ (MW_{AS_n} = Molekulargewicht des Aminosäurerestes n; $Menge_{AS_n}$ = im Analysator gemessene, relative Menge des Aminosäurerestes n; V_{AS_n} = partielles spezifisches Volumen des Aminosäurerestes n) berechnet wird, kann bei Mittelwertbildung aus einer großen Anzahl von Analysen der mögliche Fehler für $^*V$ als klein (< 0.3%) angesehen werden. Daraus folgt für $(1 - ^*V\rho)$ ein Fehler von maximal ± 2.5%.

Die Fehler für die einzelnen Meßgrößen verhalten sich additiv zueinander; man kann jedoch erwarten, daß sie sich zum Teil gegenseitig aufheben. Als maximale Fehlerabweichung ergibt sich ± 9%, das bedeutet bei einem M_w = 73 000 eine mögliche Abweichung von ± 7000.

2.61 Molekulargewichtsbestimmung nativer PDH auf Biogel: PDH im Rohextrakt der ace$^-$-Mutante A 10 wurde gemeinsam mit Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe (ADH) und Katalase (C.F. Boehringer und Söhne, Mannheim) bei 4°C auf Biogel P-300 (Ausschluß bei MW = 300 000) und auf Biogel A-15 M (Ausschluß bei MW = 15 Millionen) chromatographiert. Die Säulen (Durchmesser 2.5 cm, Füllhöhe 70 cm) waren mit 0.05 M Tris-Puffer pH 7, 0.1 M KCl äquilibriert, der gleiche Puffer wurde zur Elution der Proteinfraktionen benützt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2.7 ml gesammelt.

Reihenfolge und Abstand der Enzymbanden wurden durch Aktivitätsmessung bestimmt, die betreffenden Enzymeinheiten sind folgendermaßen definiert:

(a) Katalase-Einheiten = 1 µMol H_2O_2/min., gemessen bei λ = 240 mµ; ε = 0.036 cm^2/µMol;

(b) Alkoholdehydrogenase-Einheiten = 1 µMol NADH/min., gemessen bei λ = 366 mµ; ε = 3.4 cm^2/µMol;

(c) PDH-Einheiten = 1 µMol Acetylphosphat (s. PDHK-Test, Seite 7), gemessen bei λ = 546 mµ; ε = 0.6 cm^2/µMol.

2.7 Aminosäurenanalysen

Lyophilisierte PDH (0.8-1.2 mg Tr.Gew.) wurde in eine Hydrolysenampulle überführt und in 1 ml 2-fach destillierter, konstant siedender HCl (5.7 n) suspendiert; nach Verdrängung der Luft durch N_2 wurde die Ampulle evakuiert, zugeschmolzen und die Probe bei 110°C inkubiert. In Routine-Hydrolysen betrug die Hydrolysezeit 36 Stunden, einige Vergleichshydrolysen mit 48 Stunden Hydrolysedauer und zwei Hydrolysekinetiken mit längeren Inkubationszeiten wurden durchgeführt.

Das Hydrolysat wurde im Vakuum getrocknet und nach der Methode von Spackman, Moore und Stein (53) auf dem automatischen Aminosäure-Analysator "Uvichord" der Firma Beckman, München, analysiert. Das Gerät war mit einer Mikrozelle ausgestattet.

Als Gerät-Konstanten für die einzelnen Aminosäuren wurden Mittelwerte aus insgesamt 18 Testanalysen und 3 verschiedenen Ausgangsgemischen zugrundegelegt, nachdem in käuflichen Testgemischen Schwankungen sowohl der absoluten Mengen als auch der relativen Aminosäureanteile festgestellt worden waren. Der Cysteingehalt wurde nach Oxydation in Perameisensäure als Cysteinsäure gemessen; Oxydationszeiten von 3 und 5 Stunden führten zu gleichen Cysteinsäure-Werten. Tryptophan wurde spektrophotometrisch bei 410 mμ als 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Derivat (2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid wurde bezogen von Mann Research Laboratories) nach Barman und Koshland (1) bestimmt.

2.8 Tryptischer Abbau

Native und oxydierte PDH wurde tryptisch abgebaut: Trypsin (2-fach krist., TRL 6FA, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, U.S.A.), entweder mit 0.0625 M HCl 18 Stunden bei 37°C inkubiert oder mit TPCK (L-1-Tosylamid-2-phenylaethylchloromethylketon, bezogen von Sigma Chemical Company, Missouri, U.S.A.) nach Kostka und Carpenter (33) vorbehandelt, wurde im Verhältnis 1:50 dem Protein, das in 0.05 n $(NH_4)HCO_3$ pH 8.5 gelöst war, zugesetzt und bei 37°C inkubiert; zwei Stunden Inkubationszeit erwiesen sich für eine vollständige Spaltung als ausreichend, es entstanden keine unlöslichen Spaltprodukte. Die Reaktion wurde durch Einfrieren und anschließende Lyophilisation der Proben beendet.

Die papierchromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte nach Katz et al. (27): 3-5 mg des in H_2O gut löslichen Peptidgemisches wurden auf Whatman 3MM-Papier aufgetragen und in Butanol - Eisessig - Wasser = 4:1:5 18 Stunden bei 25°C chromatographiert. Optimale Reproduzierbarkeit wurde erzielt, indem das Chromatographie-Gemisch jeweils 5 Stunden vor Beginn des Auftrennungsschritts angesetzt wurde.

Die Chromatogramme wurden in warmer Luft getrocknet und anschließend in Pyridin - Eisessig - Wasser = 1:10:289 1.5 Stunden bei 2000 Volt elektrophoriert.

Die aminosäurenspezifischen Anfärbungen der "fingerprints" wurden nach den bei Easley (6) zusammenfassend angegebenen Verfahren vorgenommen (s. auch Tabelle V und Abb. 19b).

2.91 Untersuchungen über C-terminale Aminosäuren

Enzymatische Abbauversuche mit Carboxypeptidase A (COA-DFP, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, U.S.A., oder COA 3 x krist., reinst, DFP-behandelt, frei von Aminosäuren, Trypsin und Chymotrypsin, SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg), mit Carboxypeptidase B (COBC-8GA, Worthington B.C.) oder mit beiden Enzymen gleichzeitig nach Brown et al. (2) wurden an nativer und an unter folgenden Bedingungen denaturierter PDH durchgeführt:

a) lyophilisierte PDH wurde in 0.1 M Tris-Acetat-Puffer, pH 7.7, 0.5% an Na-DS bei 37°C 24 Stunden geschüttelt; das Protein war dann "optisch" gelöst;

b) eine Lösung nativer PDH in M/10 KPP, pH 7.0, wurde 36 Stunden gegen 0.1 M Tris-Acetat-Puffer, pH 7.7, 8 M an Harnstoff, 0.5% an Na-DS dialysiert, das Dialysat 10 min. im 100°C-Wasserbad erhitzt und erneut 36 Stunden gegen 0.1 M Tris-Acetat-Puffer, pH 7.7, 0.5% an Na-DS ohne Harnstoff dialysiert; das Protein blieb während der gesamten Prozedur in Lösung.

Beide abbauenden Enzyme wurden der PDH-Fraktion in einem Gewichtsverhältnis von 1:50 zugesetzt, der Abbau bei 25°C durchgeführt. Zur Beendigung der Reaktion wurde die jeweils entnommene Probe in ein gleiches Volumen 10%iger Trichloressigsäure pipettiert, das Präzipitat abzentrifugiert, einmal mit 5%iger Trichloressigsäure gewaschen, die vereinigten Überstände dreimal mit gleichem Volumen Äther ausgeschüttelt (zur Entfernung der Trichloressigsäure) und auf den Aminosäurenanalysator gegeben.

Bei sukzessivem Abbau mit COA und COB wurde die Probe nach COA-Behandlung 5 min. im kochenden Wasserbad erhitzt, was zu einer Inaktivierung der COA bis unterhalb der Meßbarkeit der proteolytischen Spaltung von L-Hippuryl-Phenylalanin ausreicht; die Anwesenheit des Na-Dodecylsulfats verhindert Präzipitation des Proteins. Nach Zugabe von COB wurde erneut bei 25°C inkubiert und die Reaktion durch Präzipitation mit 10%iger Trichloressigsäure beendet; das Reaktionsgemisch wurde weiterbehandelt, wie beschrieben.

Korrekturwerte resultierten entweder aus getrennter Inkubation von PDH einerseits und COA und COB andererseits oder

aus der Inkubation eines Gemisches aller Komponenten nach Inaktivierung der Carboxypeptidasen.

2.92 Untersuchungen über N-terminale Aminosäuren

2.921 Carbamylierung des Proteins: 35 mg PDH wurden nach der Methode von Stark und Smyth (54) behandelt. Die C2-Fraktion enthielt noch basisches Peptid, weshalb diese Fraktion zur Auswertung nicht geeignet war.

2.922 Dansylierung des Proteins: Diese Methode zum qualitativen Nachweis von Aminosäuren ist mit mμMol-Mengen an Protein durchführbar. Um die zu dansylierende PDH frei von Aminosäurenverunreinigungen zu erhalten, wurde die Proteinlösung je 72 Stunden gegen 6 M Guanidinium·HCl, gegen H_2O und gegen 0.5 M $NaHCO_3$, 8 M Harnstoff dialysiert. In letzterem Lösungsmittel wurde das Protein nach Gray (14) mit 15 mg Dansylchlorid (5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid, Pierce Chemicals, gelöst in dem der Proteinlösung entsprechenden Volumen Aceton), 5 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert, anschließend solange gegen 8 M Harnstoff dialysiert, bis die umgebende Dialysierflüssigkeit ohne Fluoreszenz blieb. Bei der nachfolgenden Dialyse gegen H_2O fiel das Protein aus. Die Suspension wurde in eine Hydrolyseampulle überführt, lyophilisiert und in 5.7 n HCl 36 Stunden hydrolysiert, wie beschrieben.

Das Hydrolysat wurde in 0.1 ml eines Gemisches Aceton : 0.1 M Essigsäure = 3:2 aufgenommen und dünnschichtchro-

matographisch auf Silicagel G nach Seiler und Wiechmann (50) mit geringen Modifikationen der Laufmittel charakterisiert. Als Vergleichs-Dansylaminosäuren wurden Präparate von Mann Research Laboratories benützt.

2.923 Leucinaminopeptidase-Abbau: Das abbauende Enzym (LAP DFP, 6KB; Worthington B.C., Freehold, New Jersey, U.S.A.) wurde der PDH-Lösung im Verhältnis 1:100 zugesetzt, der Abbau in 0.02 M Tris·HCl-Puffer, pH 8.5, bei 37°C durchgeführt; teilweise enthielt der Puffer 0.05% Na-DS, was die Aktivität der LAP nicht beeinträchtigte.

Das Reaktionsgemisch wurde mit 12.5% Trichloressigsäure zu einer Endkonzentration von 5% Trichloressigsäure gefällt, das Präzipitat abzentrifugiert, einmal mit 0.5 ml 5%iger Trichloressigsäure gewaschen, die Überstände vereinigt, dreimal mit gleichem Volumen Diäthyläther ausgeschüttelt und die wässrige Phase auf den Aminosäurenanalysator gegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Reinigung des PDHK und Abtrennung der PDH

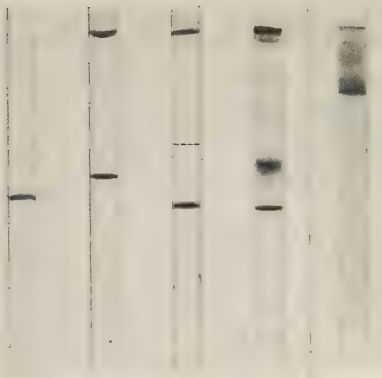
Das modifizierte Anreicherungsverfahren ermöglicht die Aufarbeitung einer Zellmenge von ca. 1800 g entsprechend ca. 2 g PDHK im Rohextrakt bis zum hochgereinigten Präparat in etwa 8 Tagen. In Tabelle I sind die Daten einer Aufarbeitung zusammengestellt.

Reinigungsschritt	Volumen	Gesamt-protein	$Q \frac{E_{280}}{E_{260}}$	Enzym-einheit.	spezif. Aktivität	Anreicherung
	ml	mg		µmol/h $\times 10^6$	µmol/h /mg Protein	
Rohextrakt	1480	65000	–+)	5.7	88	–
1. Protaminsulfatfällung 32 Vol %, Überstand	1930	–	–	5.7	–	–
2. Protaminsulfatfällung 8 Vol %, Eluat	35	2620	–	4.5	1720	20 fach
Säurefällung pH 6.1-5.8	23	1740	1.00	3.2	1840	21 "
Zentrifugation (100 000 x g)	30	1170	1.31	3.2	2740	31 "
Ca-Phosphatgel-Cellulose	16	940	1.42	3.2	3400	39 "

Tabelle I: Daten einer PDHK-Aufarbeitung (Erläuterungen s. Text)

+) Werte nicht bestimmt

Alle Versuche einer weiteren Anreicherung blieben erfolglos, so Elektrophorese in einem Rohrzucker-Dichtegradienten, Fraktionierungsversuche auf Sepharose, DEAE-Cellulose und durch Fällung mit Ammonsulfat. Zur weiteren Reinheitsprüfung wurde der PDHK einer analytischen Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen (s. Abb. 2). Der Komplex wandert bei Acrylamidkonzentrationen < 3% einheitlich, anteilmäßig grössere Verunreinigungen sind nicht erkennbar; die Porengröße eines 5%igen Gels schließt den RK bereits aus. Er bleibt auf der Oberfläche des Gels zurück, während die PDH als einheitliche Bande zur Anode wandert. Diese Bande wird in 7%igem Gel in zwei und in 15%igem Gel in mehrere verschieden starke Banden zerlegt, deren Identität mit der PDH-Fraktion wie auch die des zurückgehaltenen Proteins mit dem RK in ergänzenden Elektrophoresen gezeigt werden konnte (s. unten).



(a) (b) (c) (d) (e)

Abb. 2: Polyacrylamidgelelektrophorese von PDHK bei verschiedenen Gel-Konzentrationen im Tris·HCl-System, pH 6.8:

(a) in 3%igem Gel wandert der PDHK einheitlich,
(b) 5%iges Gel; der RK wird auf der Oberfläche des Gels zurückgehalten, die PDH wandert in einer Bande zur Anode,
(c) 5%iges Gel im oberen, 7%iges Gel im unteren Säulenabschnitt; unterhalb der Trennlinie (---) beginnt die PDH sich in zwei starke und eine schwache Bande aufzuspalten,
(d) 7%iges Gel; die Trennung der Banden ist aufgrund des längeren Weges in 7%igem Gel weiter fortgeschritten,
(e) PDH in 15%igem Gel zum Vergleich: mindestens 5 Banden sind erkennbar.

Die Elektrophorese des PDHK in steigenden Gelkonzentrationen zeigt, daß die für die Bindung der PDH an den Komplex verantwortlichen elektrostatischen Kräfte nicht ausreichen, diese Bindung bei geringfügiger Erhöhung der Molekularsiebwirkung gegen das vorhandene elektrische Feld aufrechtzuerhalten, während der RK wohl in seiner ursprünglichen komplexen Struktur erhalten bleibt. Es dürfte sich hierbei um das gleiche Phänomen handeln, das bei pH-Werten > 9 zur Dissoziation von PDH und RK führt.

Für eine bemerkenswerte Instabilität des PDHK spricht auch die Beobachtung, daß sich die angereicherte Enzymfraktion bei Elution von Calciumphosphatgel-Zellulose unter diskontinuierlicher Zunahme der Ionenstärke im Elutionspuffer in mehrere inaktive Banden aufspalten läßt (s. Abb. 3).

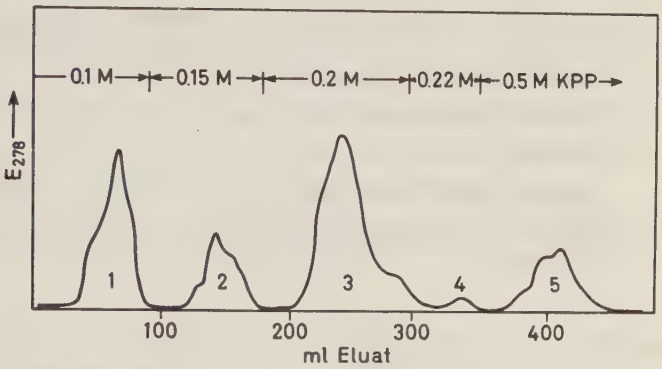


Abb. 3: Elutionsdiagramm einer PDHK-Fraktion von Calciumphosphatgel-Zellulose, äquilibriert mit 0.05 M KPP, pH 7.5, bei diskontinuierlicher Zunahme der Ionenstärke im Elutionspuffer. Bei der ersten, farblosen, mit 0.1 M KPP, pH 7.5, eluierten Bande handelt es sich um Verunreinigungen mit einem Anteil nicht adsorbiertem PDHK. Die nachfolgenden 4 Banden, eluiert mit 0.15 M KPP, 0.2 M KPP, 0.22 M KPP und 0.5 M KPP (jeweils pH 7.5), waren gelb gefärbt und zeigten starke Fluoreszenz (s. auch Text und Tabelle II). Bande 5 sollte teilweise mit Bande C der Abb. 1 identisch sein.

Enzymatische Komplementation zwischen den Banden (2)-(5) findet nicht statt, dagegen komplementieren diese Fraktionen mit der Mutante A 24 (18), die eine Punktmutation im PDH-Gen trägt. Die Mutante bildet inaktiven PDHK, dessen Aktivität

durch Zugabe von Wildtyp-PDH zum Mutantenextrakt auf Wildtyp-Niveau rekonstituiert werden kann. Wie aus Tabelle II ersichtlich, läßt sich ein entsprechender Rekonstitutionseffekt mit den Proteinfraktionen entsprechend den Banden (3)-(5) erzielen.

Fraktion	Elutionspuffer	Farbe	Q $\frac{E_{280}}{E_{260}}$	Aktivitätsverlust in %	komplementierende spezif. Akt. von A24
Bande (1)	0.1 M KPP, pH 7.5	farblos	1.04	70	4
Bande (2)	0.15 M KPP, pH 7.5	gelb	1.42	89	–+)
Bande (3)	0.20 M KPP, pH 7.5	gelb	1.42	97	24
Bande (4)	0.22 M KPP, pH 7.5	gelb	–	71	23
Bande (5)	0.5 M KPP, pH 7.5	gelb	1.29	84	12
Wildtyp-PDH		farblos	1.8-2.0		10

Tabelle II: Inaktivierung des PDHK (spezifische Aktivität = 1100) durch Elution von Calciumphosphatgel-Zellulose mit Puffer diskontinuierlich zunehmender Ionenstärke, sowie Komplementation der PDH-Mutante A 24 durch die Fraktionen (3)-(5).

+) Werte nicht bestimmt

Der Gehalt an fluoreszierendem Material und ein Q E_{280}/E_{260}, vergleichbar dem des gereinigten PDHK, deuten an, daß bei der diskontinuierlichen Elution keine Dissoziation des Komplexes in PDH und RK stattgefunden hat, sondern eher eine Fraktionierung in nicht mehr aktive, aber noch komplementierende Bestandteile. Wegen der Art der Mutation in A 24 muß es die PDH-Fraktion sein, deren räumliches Verhältnis zum RK entweder durch die Vorbehandlung verändert ist, oder die infolge Inaktivierung des RK ihre enzymatische Funktion nicht mehr erfüllen kann.

Auch die bei der Abtrennung der PDH vom PDHK gemachten Beobachtungen sprechen dafür, daß es sich bei dieser Dissoziation nicht um einen einheitlichen Vorgang handelt, sondern daß sich die PDH-Moleküle sukzessiv vom RK lösen. Bei Vorinkubation des zu fraktionierenden PDHK (1/2 Stunde bei pH 9.5, eingestellt mit 0.5 n KOH) wurde die PDH in einer fast symmetrischen Bande eluiert, deren Breite etwa der des RK entsprach (Abb. 4). Die enzymatische Aktivität der abgetrennten PDH ist nicht über alle Fraktionen der Bande hinweg konstant, sondern zeigt ein mit der höchsten Proteinkonzentration zusammenfallendes Maximum; dem parallel ändert sich das Elektrophoresemuster in 15% Acrylamid (s. Abb. 4).

Daß es sich bei der langsamer wandernden, starken Bande der Fraktionen (V)-(VIII) nicht um Verunreinigungen, sondern um eine elektrophoretisch sichtbare Veränderung der PDH handelt, die von einer Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität begleitet ist, geht aus mehreren Befunden hervor:

(1) Die Vielzahl der Banden in allen Fraktionen kann als Folge der hohen Gelkonzentration angesehen werden. Elektrophorese der vereinigten Fraktionen (I)-(VIII) in 7.5%igem Polyacrylamid bei pH 6.8 führt zu einer schneller wandernden, starken und einer langsamer wandernden, schwachen Bande (Abb. 5(a)), die jedoch beide enzymatische Aktivität zeigen (nachgewiesen durch Reduktion von 3(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid in Gegenwart von Pyruvat und TPP) und

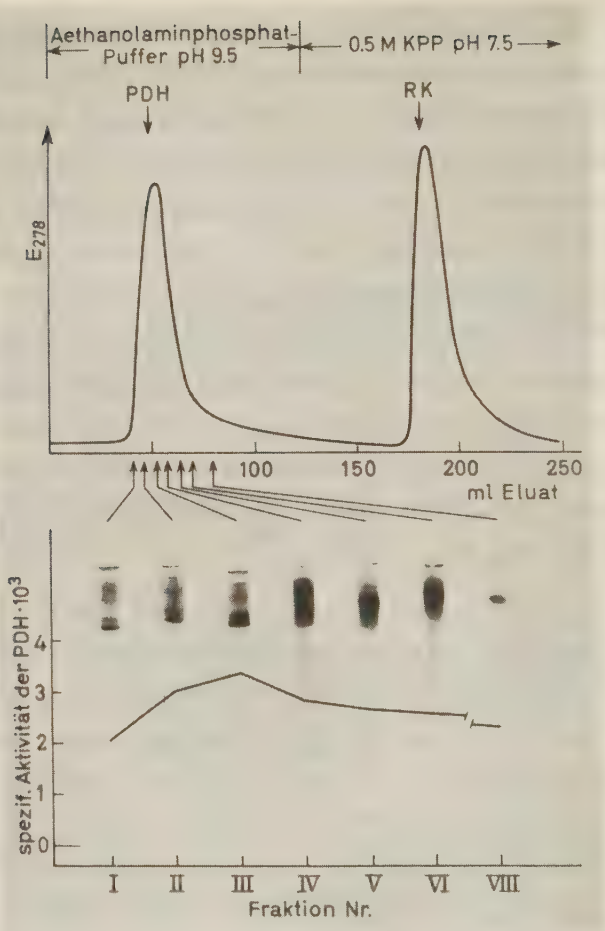


Abb. 4: Abtrennung der PDH vom RK nach Vorinkubation bei pH 9.5; oben Elutionsdiagramm: die PDH wird ebenso scharf eluiert wie der RK; unten Elektrophoresemuster und spezifische Aktivitäten der einzelnen PDH-Fraktionen: Die relative Anordnung der Banden zueinander stimmt in allen Fraktionen weitgehend überein, wesentliche Unterschiede bestehen in den relativen Farbintensitäten (≡ Proteinanteilen) der Banden.

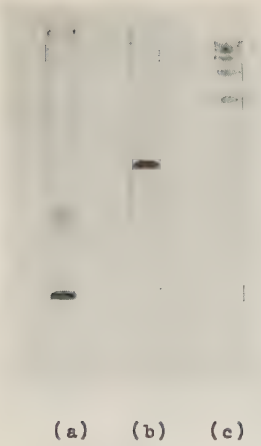


Abb. 5:
Elektrophorese von PDH in 7.5%igem Polyacrylamid unter verschiedenen Bedingungen:
(a) Tris·HCl-System, pH 6.8
(b) Tris·HCl-System, pH 9.05
(c) Tris·HCl-System, pH 6.8, 5 M Harnstoff

bei pH 9.05 zu nur einer Bande (Abb. 5(b)). In Gegenwart von 5 M Harnstoff bei pH 6.8 sind insgesamt 6 Banden sichtbar, wobei die absoluten Abstände von der Startzone sich von Bande zu Bande verdoppeln (Abb. 5(c)). Ein derartiges Verhalten ist für ein Gemisch verschiedener Proteine nicht zu erwarten.

(2) Ursprünglich hochaktive PDH (vergleiche z.B. Fraktion III, Abb. 4) geht infolge eines Alterungsprozesses durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in einen der Fraktion (VIII) in Abb. 4 vergleichbaren Zustand über. Dabei tritt ein Verlust von 20-40% der enzymatischen Aktivität ein.

(3) Dissoziation des PDHK ohne vorherige Inkubation bei pH 9.5 führte zu einer Aufspaltung der PDH-Fraktion in zwei sich mehr oder weniger stark überlappende Banden (Abb. 6) mit einem Minimum der enzymatischen Aktivität

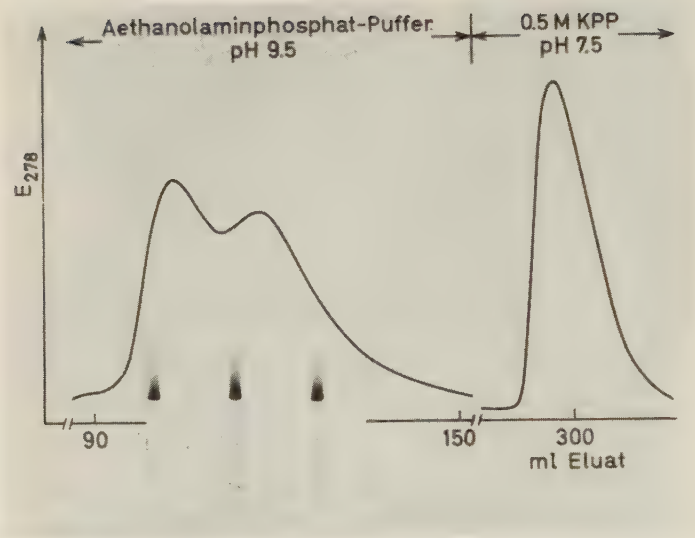


Abb. 6: Abtrennung der PDH vom RK ohne Vorinkubation; die PDH wird in einer zweigipfeligen Zone eluiert, die wesentlich breiter ist als die RK-Bande. Die PDH verhält sich über das gesamte Elutionsprofil hinweg elektrophoretisch einheitlich und unter reduzierenden Bedingungen auch weitgehend homogen (s. auch Text).

zwischen den Banden. Elektrophorese in 15%igem Polyacrylamid bei pH 6.8 ergab über alle Fraktionen hinweg ein annähernd gleiches, etwa dem der Fraktionen (I)-(III) in Abb. 4 entsprechendes Bandenschema. Die spezifische Aktivität derart dissoziierter PDH-Fraktionen war ca. 10-20% höher als nach Vorinkubation bei pH 9.5 und die Abtrennung vom RK vollständiger (s. Methoden).

Unter sonst identischen, aber reduzierenden Bedingungen während der Elektrophorese (Vorinkubation der PDH-Fraktionen für 2 Stunden in 0.1 M 2-Mercaptoaethanol; Kathodenpuffer 0.02 M an 2-Mercaptoaethanol) gehen die langsamer wandernden Banden nahezu quantitativ in die erste Bande über; dies gilt über den gesamten Bereich des Elutionsprofils (s. Abb. 6).

Bei der Isolierung der PDH ohne Vorinkubation findet die Dissoziation der Komponenten auf der Säule statt. Das zweigipfelige Elutionsprofil legt die Vermutung leichter und weniger leicht abdissoziierender PDH-Moleküle nahe, was nach Vorinkubation des PDHK nicht mehr unterscheidbar ist. Die Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Elektrophoresen von PDHK bei verschiedenen Gelkonzentrationen (s. Abb. 2) sind wegen der unterschiedlichen Bedingungen der Dissoziation mit den zuletzt beschriebenen Daten kaum vergleichbar, sie stehen aber nicht in Widerspruch zu ihnen.

Um die chemische Homogenität der isolierten PDH zu demonstrieren, wurde eine Elektrophorese der vereinigten PDH-Fraktionen in 15%igem Polyacrylamid bei pH 6.8 ohne 2-Mercaptoaethanol im präparativen Maßstab durchgeführt. Durch kurzes Anfärben des Gelblocks in 0.05%iger Anilinschwarzlösung in 7%iger Essigsäure (Anilinschwarz von Canalco, Bethesda, U.S.A.) wurde das Bandenmuster markiert, es entsprach der Fraktion (III) in Abb. 4. Die am schnellsten wandernde, starke Bande wurde ausgeschnitten, mit ca. 30 ml Puffer (61) (0.1 M $(NH_4)_2CO_3$, 1% 2-Mercaptoaethanol,

0.1% Na-DS) in einem Homogenisator (E. Bühler, Tübingen) bei 32 000 Upm zerkleinert und das Protein unter mehrmaligem Einfrieren und Auftauen extrahiert. Tryptischer Abbau dieser Proteinfraktion führte zum gleichen Peptidmuster (vgl. Abb. 7 und Abb. 19b), saure Hydrolyse zur gleichen Aminosäurenzusammensetzung (Tabelle IV, Spalte 3) wie im Gesamtprotein.

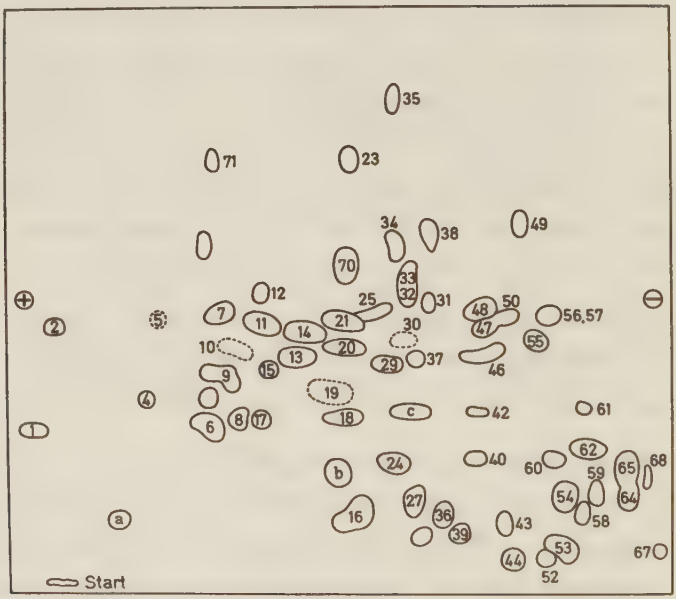
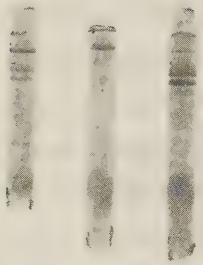


Abb. 7: Tryptischer "fingerprint" der in 15% Polyacrylamid am schnellsten wandernden Proteinbande. Das Peptidmuster des vor dem tryptischen Abbau mit Perameisensäure oxydierten Proteins stimmt weitgehend mit dem des Gesamtproteins überein (s. auch Abb. 19). Die Peptide 10, 19 und 30 waren schwach sichtbar; die unvollständige Oxydation in diesem Fall steht möglicherweise im Zusammenhang mit der zu beobachtenden starken Aggregation der PDH nach Behandlung mit 1% Na-DS.

Ein weiteres Kriterium für die Homogenität der PDH-Fraktion konnte aus einem elektrophoretischen Vergleich von PDHK, PDH und RK gewonnen werden. Bei diesen Versuchen entstanden erhebliche Schwierigkeiten, da die Bindungskräfte zwischen LAT und LDH sich als wesentlich stärker erwiesen als zwischen PDH und RK. Die Versuche mit nativem PDHK hatten gezeigt, daß der RK bereits von 5%igem Acrylamidgel ausgeschlossen wird (Abb. 2(b)-(d)). Versuche unter denaturierenden Bedingungen (6 M Harnstoff, 0.1% Na-DS) führten zum gleichen Ergebnis. Nach Reduktion und Carboxymethylierung oder Oxydation des PDHK war das lyophilisierte Protein auch in Gegenwart von 8 M Harnstoff und 0.1 - 0.5% Na-DS nur noch gering löslich. Lediglich ein geringer Anteil der PDH-Fraktion wanderte in 15%igem Polyacrylamid bei pH 6.8 zur Anode, ein großer Teil des Proteins blieb auf der Oberfläche des Gels zurück. Folgende Bedingungen führten schließlich zu einem befriedigenden Ergebnis: Nativer PDHK, PDH und RK wurden getrennt 2 Stunden bei Raumtemperatur im Tris·HCl-System, pH 6.8, 6 M Harnstoff, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol, 0.03% Na-DS inkubiert und anschließend in 15% Polyacrylamid elektrophoriert, wobei der Kathodenpuffer 0.01 M 2-Mercaptoaethanol und 0.03% Na-DS enthielt. Das Ergebnis dieser Elektrophorese ist in Abb. 8 dargestellt. Ein Vergleich der drei verschiedenen Ansätze ermöglicht die Unterscheidung zwischen PDH und RK. Das PDHK-Präparat (Abb. 8(a)) enthielt nur eine gering-



(a) (b) (c)

Abb. 8:

Elektrophorese von PDHK (a), PDH (b) und RK (c) in 15% Acrylamid-Tris·HCl-System, pH 6.8, 6 M Harnstoff, 0.01 M 2-Mercaptoaethanol, 0.03% Na-DS

(a) 20 γ PDHK aufgegeben
(b) 17 γ PDH aufgegeben
(c) 60 γ RK aufgegeben

fügige Verunreinigung, die bei der Abtrennung der PDH auf Calciumphosphatgel-Zellulose beim RK verbleibt und bei der es sich auch um das Dissoziationsprodukt einer der RK-Enzymkomponenten handeln kann. In der PDH-Fraktion waren auch bei der doppelten Proteinkonzentration (35 γ aufgetragen) keine Nebenbanden sichtbar. Der RK enthielt, wie aufgrund der Aktivitätsmessungen zu erwarten, noch etwas PDH, ein Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen bzw. der Intensitäten der PDH- und RK-Banden von 8(b) und 8(c) macht jedoch deutlich, daß der beim RK verbliebene PDH-Anteil relativ gering ist.

In Tabelle III sind die Daten einer Auftrennung des PDHK bei pH 9.5 ohne Vorinkubation zusammengefaßt. Das Proteinverhältnis in allen Präparationen nach diesem Verfahren war: PDH : RK = (58-60%) : (42-40%); der RK enthielt stets noch

PDHK-Aktivität, dagegen war PDHK-Aktivität selbst in konzentrierten PDH-Fraktionen (> 20 mg/ml) nicht nachweisbar. Die enzymatische Aktivität der PDH im Komplementationstest mit RK lag im allgemeinen zwischen 80% und 95% der ursprünglich vorhandenen.

Fraktion	Gesamt-protein	Protein-anteil	Q $\frac{E_{280}}{E_{260}}$	spezif. Aktivität	verbliebene PDHK-Aktivität
	mg	%		µmol/h /mg Protein	%
PDHK	290	100	1.42	3600	100
PDH	168	59	2.00	5500	0
RK	116	40	1.20	6000	2

Tabelle III: Daten einer PDHK-Auftrennung; Proteinbestimmung und Aktivitätsmessung siehe Methoden; die enzymatische Aktivität der PDH wurde als Komplementationsaktivität mit RK gemessen.

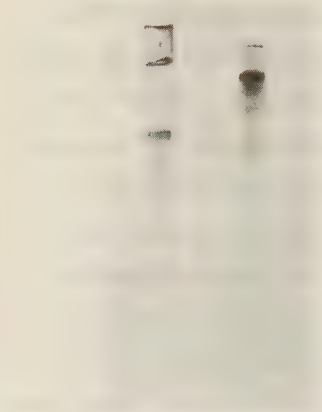
Die beschriebenen Versuche zeigen, daß die isolierte PDH-Fraktion, wenn überhaupt, nur geringfügige Verunreinigungen enthielt, die für die nachfolgenden proteinchemischen Untersuchungen ohne Bedeutung waren. Mehrere Banden bei Elektrophorese der PDH unter bestimmten Bedingungen konnten unter anderen Bedingungen auf eine Bande reduziert werden, wobei eine Mehrzahl an Banden wahrscheinlich Aggregate repräsentiert (s. auch Abb. 5(c) und spätere Versuche). Oxydationseffekte durch noch vorhandenes Ammoniumperoxodisulfat, wie von Mitchell (37) beschrieben, sind trotz des mit 2-Mercaptoaethanol zu beobachtenden Effekts (s. Abb. 6) ausgeschlossen, da nach Polymerisation des Trenngels mit Riboflavin und

Licht in 15% Polyacrylamid dasselbe Bandenmuster für PDH beobachtet wird wie nach Polymerisation mit Ammonium-peroxodisulfat.

Das zweigipfelige Elutionsprofil der PDH bei "schonender" Dissoziation des Komplexes kann zwei verschiedene Arten der Bindung der PDH-Moleküle wiederspiegeln. Es tritt nicht auf bei Dissoziation von gereinigten Komplexen aus zwei PDH-Mutanten mit Aminosäure-Substitution.

3.2 Carboxymethylierung und Oxydation der PDH

Polyacrylamidgelelektrophorese sowohl des reduzierten und carboxymethylierten als auch des oxydierten Proteins im Tris·HCl-Puffersystem, pH 6.8, 6 M Harnstoff führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abb. 9). Die Hauptmenge des Proteins



(a) (b)

Abb. 9: Polyacrylamidgelelektrophorese im Tris-Puffer-System, pH 6.8, 6 M Harnstoff, 0.1 M Mercapto-aethanol von
(a) reduzierter und carboxy-methylierter PDH, Laufzeit ca. 16 Stunden;
(b) oxydierter PDH, Laufzeit ca. 7 Stunden.

wanderte wie das unbehandelte Enzym, begleitet von 6 - 8 schwachen, vorwiegend schneller wandernden Banden; die Gegenwart von 0.03% Na-DS änderte an diesem Bild nichts. Zu einem ähnlichen Bandenmuster führte auch die Re-elektrophorese der in präparativem Maßstab getrennten und extrahierten ersten Proteinbande (entsprechend Abb. 4, F III; siehe vorne). Dieses Phänomen wurde bei allen derartigen Versuchen beobachtet, wobei die auftretenden Nebenbanden leicht variierten, und ist kaum einheitlich zu interpretieren; unspezifische Nebenreaktionen wie zusätzliche Carboxymethylierungen, Zerstörung gewisser Aminosäuren oder Spaltung von Peptidbindungen bei Oxydation, ferner Aggregatbildungen sind denkbar. Bemerkenswert erscheint, daß sowohl das reduzierte und carboxymethylierte als auch das oxydierte Protein elektrophoretisch mit der gleichen Geschwindigkeit wandert wie die native PDH. Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, daß die Oxydation des Proteins mit Perameisensäure bezüglich der Cystein-Reste vollständig war. Die Versuche gaben in keinem Fall Anhaltspunkte für das Vorhandensein nichtidentischer Untereinheiten in der PDH, da keine der Nebenbanden in auch nur annähernd vergleichbarer Stärke zur Hauptbande auftraten.

Trennungsversuche auf DEAE-Cellulose und Sephadex G-160 in Anwesenheit von 6 M Harnstoff und 0.1 M 2-Mercapto-aethanol brachten ebenfalls nur symmetrische Elutionsprofile.

Daher wurde vorläufig auf weitere Trennungsversuche verzichtet und zur Klärung der Zusammensetzung des Enzyms die nachfolgend beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.3 Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge

3.31 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von "gealterter" PDH

Frisch präparierte PDH sedimentiert in 0.1 M KPP, pH 7.0, einheitlich, auch in Gegenwart von 0.1 M 2-Mercaptoaethanol. Für den Versuch einer Dissoziation der PDH in Untereinheiten schien die Beobachtung bedeutsam, daß native PDH durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen unter Abnahme der spezifischen Aktivität von dem elektrophoretischen Zustand der Fraktion III in Abb. 4 in den der Fraktion VIII übergeht. Diese Änderung des Elektrophoreseverhaltens konnte als Folge einer Konformationsänderung, möglicherweise einer Dissoziation des nativen Moleküls angesehen werden. Das Verhalten "gealterter" PDH in der analytischen Ultrazentrifuge war daher von besonderem Interesse.

Eine ca. 2 Monate alte, mehrfach bei -20°C eingefrorene und aufgetaute PDH-Fraktion wurde 72 Stunden gegen 0.1 M KPP, pH 7.02, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol dialysiert und in einer Überschichtungszelle nach Klainer und Kegeles (30) bei verschiedenen Konzentrationen (7.2 mg/ml; 5.4 mg/ml; 3.6 mg/ml; 2.4 mg/ml) zentrifugiert.

Wie Abb. 10 zeigt, enthielt das Dialysat zwei Komponenten, eine schneller sedimentierende ($S^{o}_{20,w}$ = 10.6 s) und eine

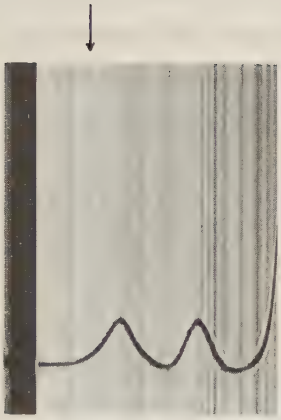


Abb. 10:
Sedimentationsverhalten der PDH nach 72 Stunden Dialyse gegen 0.1 M KPP, pH 7.02, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol. Aufnahme nach 48 min. Zentrifugation bei 42040 Upm. Zellmittelstück nach Klainer und Kegeles, Schlierenwinkel 70°; ursprünglicher Meniskus s. Pfeil. Proteinkonzentration 5.4 mg/ml.

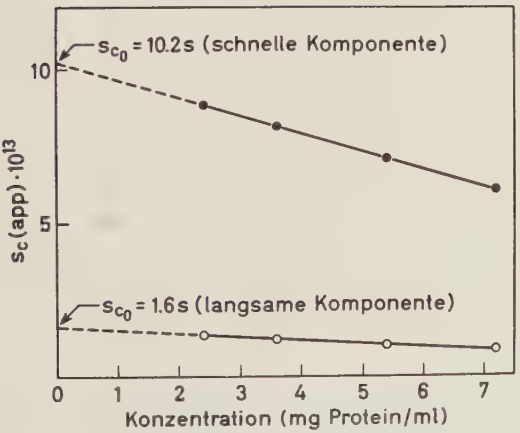


Abb. 11: Konzentrationsabhängigkeit der scheinbaren Sedimentationskoeffizienten (Sc_{app}) der schnellen und langsamen PDH-Komponente in 0.1 M KPP, pH 7.02, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol bei 20°C.

langsamere ($S^{o}_{20,w}$ = 1.7 s), die wohl eine PDH-Untereinheit repräsentieren muß; die Konzentrationsabhängigkeit der Sc_{app}-Werte ist in Abb. 11 wiedergegeben; die erhaltenen Sc_{o}-Werte wurden noch auf Wasserbasis umgerechnet (s. oben). Die vierfach stärkere Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten der schneller wandernden Komponente deutet auf eine stärkere Asymmetrie der zugehörigen Molekülform im Vergleich zu jener der langsameren Komponente (8). Der Sc_{o}-Wert für die schnellere Komponente, nicht aber die Art der Konzentrationsabhängigkeit befindet sich in Übereinstimmung mit den von Koike et al. (32) für das native Enzym beschriebenen Daten. Die Autoren geben $S_{20,w}$-Werte von 9.24 s bei 5.9 mg Protein/ml und 9.45 s bei 1.5 mg Protein/ml an, das bedeutet eine sehr geringe Konzentrationsabhängigkeit der Sc_{app}-Werte, allerdings finden sie in Äthanolaminphosphatpuffer, pH 9.5, bei einer Proteinkonzentration von 4.6 mg/ml einen $S_{20,w}$-Wert von 6.2 s. Die genaue Ursache für die stärkere, hier beschriebene Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten der schnelleren Komponente wurde nicht untersucht, sowohl die Anwesenheit von 2-Mercaptoaethanol als auch der langsamen Komponente können dafür verantwortlich sein.

Eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Komponenten war in dem vorliegenden Zwei-Komponentensystem mit genügender Genauigkeit nicht möglich. Im Folgenden wurden Bedingungen gewählt, die eine vollständige Dissoziation versprachen.

3.32 Molekulargewichtsbestimmungen in Gegenwart von 6 M Guanidinium·HCl

Ein erster Versuch in 3 M Guanidinium·HCl hatte gezeigt, daß diese Konzentration zur vollständigen Dissoziation des PDH-Moleküls nicht ausreicht.

In dem von Ullmann et al. (60) angegebenen Puffer (ohne EDTA, pH 5.9; s. Methoden) sedimentierte die Proteinfraktion bei 42040 U/min. einheitlich mit einem Sedimentationskoeffizienten $S_{20,Gua}$ = 0.65 s bei einer Proteinkonzentration von 11.2 mg/ml, wobei eine außergewöhnlich geringe Diffusion zu beobachten war. Abb. 12 zeigt die

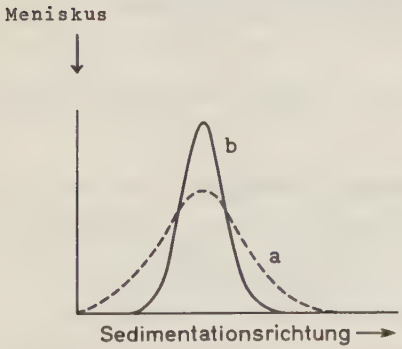


Abb. 12: Verbreiterung der Gradientenkurve nach 9 Stunden Sedimentation der PDH bei 42040 Upm in 6 M Guanidinium·HCl (a) pH 2.0 (– – –), (b) pH 5.9 (———)

Verbreiterung der Gradientenkurve nach 9 Stunden im Vergleich zu der in 6 M Guanidinium·HCl, 0.1 NaCl,

0.1 M 2-Mercaptoaethanol, pH 2.0; der Sedimentationskoeffizient in diesem Lösungsmittel wurde bei einer Proteinkonzentration von 6.0 mg/ml zu $S_{20,Gua}$ = 0.72 s gemessen, beide Werte zeigten die gleiche Abhängigkeit vom Druck- und Verdünnungseffekt [+)]. Der Unterschied in der Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins bei den verschiedenen pH-Werten ist erheblich.

Eine mögliche Erklärung für das ungewöhnliche Diffusionsverhalten des Proteins bei pH 5.9 wird darin gesehen, daß der I.P. der PDH in der Nähe von pH 5.9 liegt, wodurch mit einer starken Wechselwirkung der Moleküle gerechnet werden muß, die offensichtlich die Diffusion der Moleküle weitgehend kompensiert. Eine Präzipitation des Proteins, die man in 0.1 M KPP zwischen pH 6.0 und pH 5.7 beobachtet, wird durch die hohe Guanidinium·HCl-Konzentration verhindert.

Die Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts bei pH 5.9 mißlang; bei 10 589 Upm. wurden sehr steile Gradientenkurven erhalten. Durch eine Erniedrigung der Winkelgeschwindigkeit auf 9341 Upm. ließ sich nach 16 Stunden trotz der geringen Füllhöhe von 1.8 mm lediglich ein Abflachen der Gradientenkurve am Boden der Zelle, jedoch keine neue Gleichgewichtseinstellung erreichen, was bei dem gemessenen geringen Sedimentationskoeffizienten ebenfalls nur im Sinne stark reduzierter Diffusion verstanden

---

+) Der Sedimentationskoeffizient der PDH in 70% HCOOH (ρ_{20^oC} = 1.154 g/ml) beträgt ca. 0.7-0.8 s, stimmt also mit den Werten in 6 M Guanidinium·HCl gut überein.

werden kann (Abb. 13). Die Auswertung des Versuchs lieferte ein nicht reales Ergebnis: die Extrapolation der reziproken scheinbaren Molekulargewichte ($1/M_{app}$) gegen unendliche Verdünnung führte zu einem negativen Wert.

(a) (b) (c)

Abb. 13: Sedimentationsgleichgewichtslauf mit PDH in 6 M Guanidinium·HCl bei pH 5.9. Die Abbildung zeigt drei verschiedene Konzentrationen: (a) = 2.7 mg/ml, (b) = 4.5 mg/ml, (c) = 5.6 mg/ml in einer Sechskanalzelle nach Yphantis. Nach 24 Stunden Zentrifugation bei 10 590 Upm. wurde die Geschwindigkeit auf 9341 Upm. verringert; nach weiteren 16 Stunden (Zeitpunkt der Aufnahme) hatten sich die Gradientenkurven kaum verändert, nur am Boden der Zellen waren sie leicht abgeflacht. Schlierenwinkel 70°.

Die Molekulargewichtsbestimmung im Sedimentationsgleichgewicht bei pH 2.0 (s. auch Methoden) wurde bei 6 verschiedenen Konzentrationen (12.0, 8.0, 4.0, 3.0, 1.5, 0.7 mg Protein/ml) durchgeführt. Aus der Extrapolation der reziproken scheinbaren Molekulargewichte nach unendlicher Verdünnung (Abb. 14) errechnet sich ein Molekulargewichtsmittel M_w = 72 500 g/Mol.

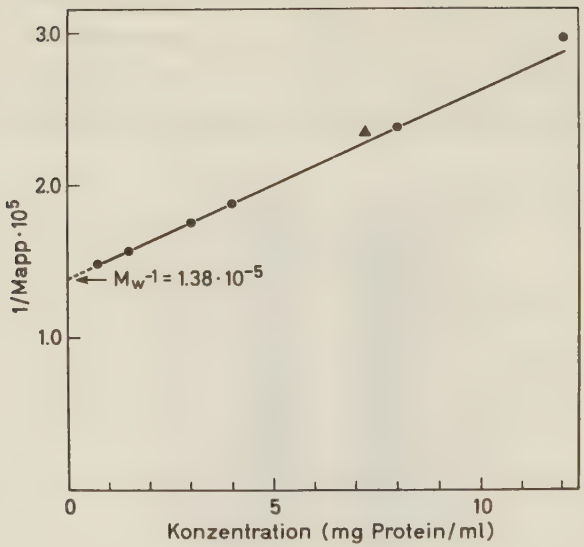


Abb. 14: Extrapolation der reziproken scheinbaren Molekulargewichte (M_{app}^{-1}) abnehmender Proteinkonzentrationen nach unendlicher Verdünnung (Versuchsbedingungen s. Text)

bei pH 2.0 bestimmte Werte: —·—·—
bei pH 7.4 bestimmter Wert: ▲

Eine ähnlich starke Konzentrationsabhängigkeit der (M_{app}^{-1})-Werte wurde von Kielley und Harrington für Myosin beschrieben.

Dieser Molekulargewichtsbestimmung liegt als Dichte des Lösungsmittels nach Kawahara und Tanford (28) der Wert ρ = 1.145 und ein um 1% verringertes partielles spezifisches Volumen (entsprechend der Aminosäurenzusammensetzung der PDH ist *V = 0.739 ml/g) *V' = 0.732 ml/g zugrunde, da nach Kielley und Harrington (29) das partielle spezifische Volumen

in 5 M Guanidinium·HCl um 1% kleiner ist als in H_2O. Dagegen blieb die von den gleichen Autoren zu maximal 5% bestimmte Bindung von Guanidinium·HCl an das Protein unberücksichtigt; bei pH 2.0 sollte wegen der ausschließlich vorliegenden positiven Ladungen am Protein- wie am Guanidinium-Molekül ein derartiger Bindungseffekt sehr gering sein.

Die Fehlerabschätzung ergab einen maximalen Fehler von ±9%. Daraus folgt:

$$M_w = 73\,000 \pm 7\,000 \text{ g/Mol.}$$

Der weiteren Absicherung obigen Ergebnisses diente ein Vergleichslauf in dem von Ullmann et al. (60) angegebenen Lösungsmittelsystem (ohne EDTA), das in diesem Fall erst nach Zugabe von 6 M Guanidinium·HCl auf pH 7.4 eingestellt war. Das im Sedimentationsgleichgewicht ermittelte scheinbare Molekulargewicht (M_{app}) war um ca. 4% niedriger (s. Abb. 14) als der bei pH 2.0 erhaltene Wert, liegt also innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen.

Auffallend sind die sehr niederen Sedimentationskoeffizienten für die PDH-Untereinheit bei 20°C sowohl in 0.1 M KPP, pH 7.02, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol ($S^o_{20,w}$ = 1.7 s) als auch in Guanidinium·HCl ($S^o_{20,w}$ = 2.1 s) gemessen an einem Molekulargewicht von 73 000, was auf einen hohen Reibungskoeffizienten für die PDH-Untereinheit hinweist. Der etwas kleinere Wert im erstgenannten Lösungsmittelsystem ist wahrscheinlich durch die Anwesenheit der schnelleren Komponente bedingt (Johnston-Ogston-Effekt, s. bei (8)).

Eine Erklärung für die Ursache dieser ungewöhnlichen Korrelation zwischen Sedimentationskoeffizient und Molekulargewicht kann bisher nicht gegeben werden; allerdings wurde kürzlich für die Untereinheit der Asparto I - Homoserin-Dehydrogenase I aus E. coli ein $S^{\circ}_{20,w}$ = 2.20 bei einem Molekulargewicht von 66 000 berichtet (59).

3.33 Entsprechend dem Vorgehen anderer Autoren (17,55) wurde eine Molekulargewichtsbestimmung in 0.05 M NaOH durchgeführt. Oxydierte, vor Oxydation elektrophoretisch einheitliche PDH wurde 96 Stunden bei 4°C gegen 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.5, dialysiert. Ein Sedimentationsgleichgewichtslauf bei 20°C führte nach 23 Stunden nicht zur Einstellung des Gleichgewichts (s. Abb. 15a).

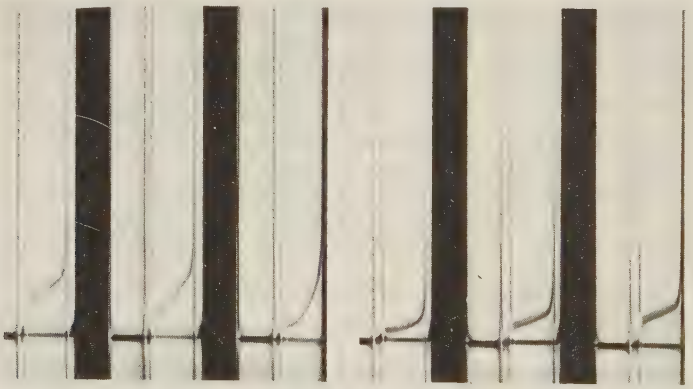


Abb. 15: Sedimentationsgleichgewichtslauf mit PDH in 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.5; (a) nach 23 Stunden aufgenommen, anschließend wurde die Zelle um 180° um ihre Längsachse gedreht und weiterzentrifugiert, (b) Aufnahme nach 200 Stunden. Schlierenwinkel in beiden Fällen 70°. Die mittlere Konzentration beider Aufnahmen ist direkt vergleichbar. Proteinkonzentrationen: 11.1 mg/ml, 7.4 mg/ml, 3.7 mg/ml in (a), in (b) Reihenfolge umgekehrt. Rotationsgeschwindigkeit 14 290 Upm.

Die fortschreitende Veränderung der Gradientenkurve wurde über insgesamt 200 Stunden hinweg beobachtet, sie äußerte sich in einer Abflachung der Kurve und Abnahme der Fläche unter der Kurve (s. Abb. 15b). Das nach 200 Stunden bestimmte Molekulargewicht betrug M_w = 25 000 g/Mol. Sedimentationsläufe nach Dialyse über 96 Stunden und 8 Tage ergaben das in Abb. 16a und b dargestellte Bild (s. auch Legende zu Abb. 16).

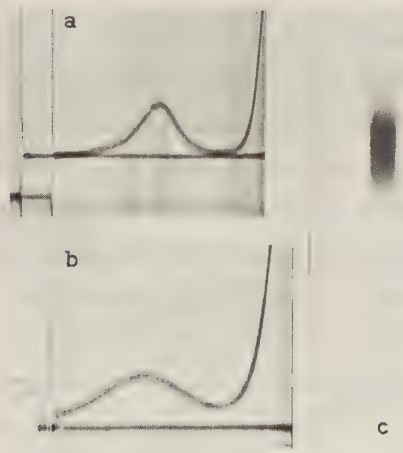


Abb. 16: Sedimentationsläufe nach verschiedenen Dialysezeiten gegen 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.5, (a) 96 Stunden, (b) 8 Tage. Die länger dialysierte Probe sedimentiert langsamer und breiter; Aufnahmen nach 4 Stunden bei 59780 Upm., die obere Gradientenkurve wurde bei einem Schlierenwinkel von 70°, die untere bei einem Schlierenwinkel von 50° aufgenommen.

(c) Polyacrylamidgelelektrophorese der 8 Tage gegen 0.05 M NaOH, 0.1 M NaCl, pH 12.5, dialysierten PDH in 12% Polyacrylamid bei pH 10.

Polyacrylamidgelelektrophorese der Dialysate bei pH 10 und 11.5 zeigte, daß derart vorbehandelte PDH nicht mehr als distinkte Bande, sondern in einer breiten diffusen Zone wandert (s. Abb. 16c). Alle diese Befunde deuten übereinstimmend auf langsame Hydrolyse des Proteins unter den genannten Bedingungen.

3.4 Molekulargewichtsbestimmung auf Biogel

Die Divergenz zwischen dem hier beschriebenen Molekulargewicht für die PDH-Untereinheit einerseits und dem bekannten Wert von Koike et al. (32) für die native PDH andererseits legte die Vermutung nahe, daß der für die native PDH bestimmte Molekulargewichtswert möglicherweise von dem Verfahren der Aufarbeitung bzw. Abtrennung des Enzyms vom Komplex beeinflußt ist. Um einen Anhaltspunkt für das Molekulargewicht der PDH ohne diese Einflüsse zu erhalten, wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten von Alkoholdehydrogenase aus Hefe (MW 150 000), Katalase (MW 250 000) und von PDH aus Rohextrakt der Mutante A 10, die zwar PDH, aber keine serologisch nachweisbare Menge an LAT synthetisiert, auf Biogel P-300 und A-15 M verglichen.

Die Versuche zeigten, daß die PDH vor (Biogel P-300) bzw. fast mit Katalase (Biogel A-15 M) eluiert wird (s. Abb. 17a + b). Aus dem Vergleich beider Versuche geht hervor, daß die PDH größer, aber nicht sehr viel größer als Katalase ist, ihr Molekulargewicht sollte zwischen 250 000 und 350 000 g/Mol liegen. Dieses Ergebnis ist gut vereinbar mit dem für die Untereinheit beschriebenen Wert.

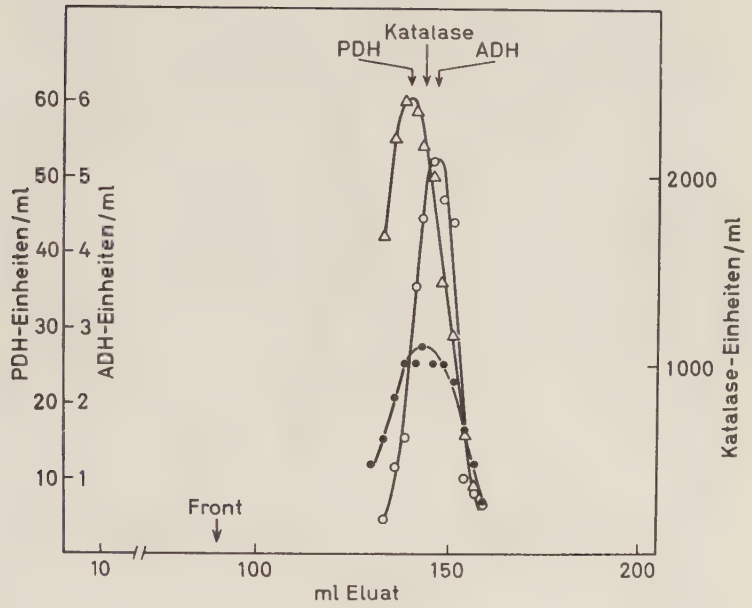


Abb. 17a: Molekulargewichtsbestimmung der PDH der Mutanten A 10 auf Biogel P-300. Das Leervolumen der Säule betrug 90 ml (Weiteres s. Methoden). Die PDH-Fraktion wurde deutlich vor der Katalase eluiert. Aufgegebene Mengen: Katalase: 2 mg; ADH: 1.5 mg; PDH: 1.0 ml A 10-Rohextrakt mit 24 mg Protein/ml und 2000 Enzymeinheiten/ml.

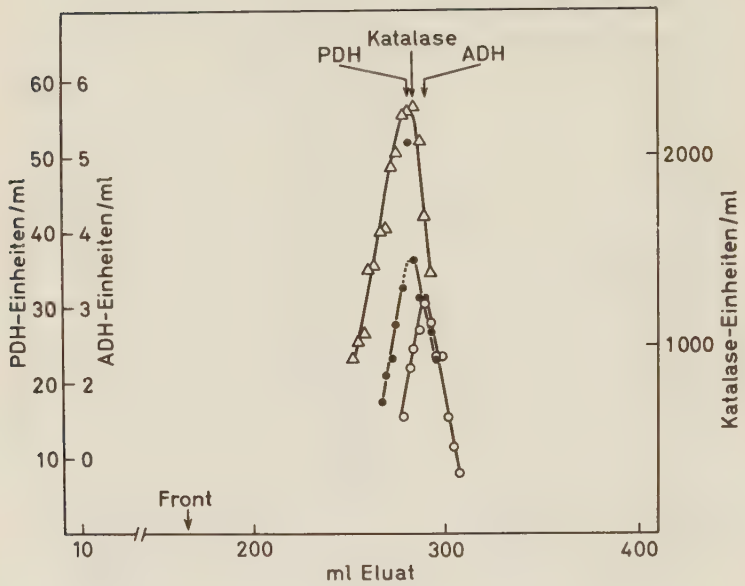


Abb. 17b: Molekulargewichtsbestimmung der PDH der Mutanten A 10 auf Biogel A-15 M. Das Leervolumen der Säule betrug 164 - 165 ml (Weiteres s. Methoden). Die PDH-Fraktion wurde genau mit der Katalase eluiert. Aufgegebene Mengen wie bei Abb. 17a.

3.5 Aminosäuren-Zusammensetzung

Die Aminosäurenzusammensetzung der PDH wurde für 6 verschiedene PDH-Präparationen an unbehandeltem und oxydiertem Protein ermittelt. Hydrolysekinetiken bei 105°C und 110°C zeigten, daß nach 36 Stunden Hydrolyse bei 110°C keine weitere Zunahme der Val-, Ileu- und Leu-Werte stattfindet. Die Abnahme von Thr und Ser während der sauren Hydrolyse bei 110°C ist in Abb. 18 dargestellt, sie beträgt nach 96 Stunden 10% für Thr und 24% für Ser.

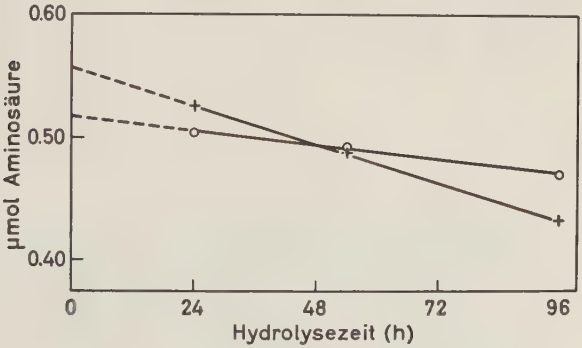


Abb. 18: Abnahme von Thr und Ser während saurer Hydrolyse von PDH bei 110°C. Die Analysen dieser Kinetik sind ebenso wie die der Kinetik bei 105°C (s. Text) in Serie I der Tabelle IV enthalten.

Ein Parallelversuch bei 105°C Hydrolysetemperatur brachte die gleichen Ergebnisse. In Tabelle IV sind die Ergebnisse verschiedener Analysen zusammengefaßt. Ein Vergleich der

Aminosäure	Serie I	relative Abweichung	extrahierte Proteinbande	Serie II	relative Abweichung	Aminosäure-reste	ganzzahliger Wert
	1	2	3	4	5	6	
	µmol	%			%	Mol/73000 g PDH	
Lys	0.0532	4.3	–+)	0.0528	6.6	35.0	35
His	0.0230	3.5	–	0.0230	2.8	15.2	15
Arg	0.0487	8.5	–	0.0507	3.6	32.8	33
Asp	0.1000	–	0.1000	0.1000	–	66.0	66
Thr *)	0.0460	1.6	0.0451	0.0452	2.2	30.1	30
Ser *)	0.0503	3.8	0.0461	0.0464	2.5	31.8	32
Glu	0.1382	1.6	0.1364	0.1365	1.9	90.6	91
Pro	0.0409	3.5	0.0375	0.0378	2.8	25.9	26
Gly	0.1007	4.5	0.0942	0.0941	2.9	64.3	64
Ala	0.0889	2.8	0.0806	0.0876	5.5	58.2	59
Val	0.0591	1.9	0.0569	0.0565	2.2	38.1	38
Met	0.0212	5.4	0.0214	0.0211	3.0	14.0	14
Ileu	0.0609	2.1	0.0594	0.0588	2.6	39.5	39
Leu	0.0769	3.8	0.0724	0.0770	4.3	50.8	51
Tyr	0.0417	10.8	0.0406	0.0417	7.5	27.5	28
Phe	0.0381	7.1	0.0376	0.0379	6.9	25.1	25
Try	–	–	–	0.0119	8.5	7.9	8
$CysSO_3H$	–	–	–	0.0057	1.0	3.8	4

Tabelle IV: Aminosäurenzusammensetzung der PDH-Untereinheit (M_W = 73 000). Wegen des schwankenden Wassergehalts des lyophilisierten Proteins sind die relativen Aminosäurenanteile auf Asparaginsäure = 0.1000 µMol, die Aminosäure mit der geringsten Streuung der Analysenwerte bezogen. Die Werte für Threonin und Serin wurden entsprechend der gemessenen Abnahme korrigiert. Spalte (1) gibt die Mittelwerte aus drei Hydrolysen des gleichen PDH-Präparats (vgl. Abb. 8(b)) wieder, Spalte (4) die Mittelwerte aus Analysen vier verschiedener PDH-Präparationen. In Spalte (2) und (5) sind die relativen Abweichungen der Aminosäurewerte vom Mittelwert der Spalten (1) und (4) berechnet, in Spalte (6) die Aminosäurereste der Mittelwerte aus den Spalten (1) und (4). Spalte (7) enthält die nächstliegenden ganzzahligen Werte der berechneten Aminosäurereste.
In Spalte (3) ist der Gehalt an sauren und neutralen Aminosäuren der elektrophoretisch abgetrennten Teilfraktion der PDH (s.S.34 und Abb. 7) angegeben.

Spalten (2) und (5) macht deutlich, daß die relativen Abweichungen zwischen verschiedenen Hydrolysaten des gleichen PDH-Präparats sich in derselben Größenordnung bewegen wie die zwischen verschiedenen PDH-Präparaten; sie sind demnach als systematische Fehler anzusehen. Die Berechnung der Aminosäurereste auf der Basis der Mittelwerte aus den Spalten (1) und (4) erscheint daher gerechtfertigt.

3.51 Aus der angegebenen Aminosäurenzusammensetzung wurde das partielle spezifische Volumen (*V) der PDH nach Cohn und Edsall (4) zu *V = 0.739 ml/g berechnet; der Wert kann wegen der hohen Anzahl der Analysen als sehr genau angesehen werden.

3.6 Tryptischer Abbau

Tryptische Spaltungen verschiedener PDH-Präparationen lieferten gut reproduzierbare "fingerprints" mit etwa 70 ninhydrinfärbbaren Flecken (s. Abb. 19a und b), wobei die Art der Vorbehandlung des Trypsin zur Beseitigung etwa vorhandener Chymotrypsinaktivität (s. Methoden) ohne Einfluß auf das Ergebnis war. Ein Teil der mit Ninhydrin nur schwach anfärbbaren Peptide zeigte nach Vorbehandlung mit Tertiärbutylhypochlorid deutliche Jod-Stärke-Reaktion, ein anderer Teil derartiger Peptide war einwandfrei als Arginin- und/oder Tyrosinpeptid charakterisierbar.

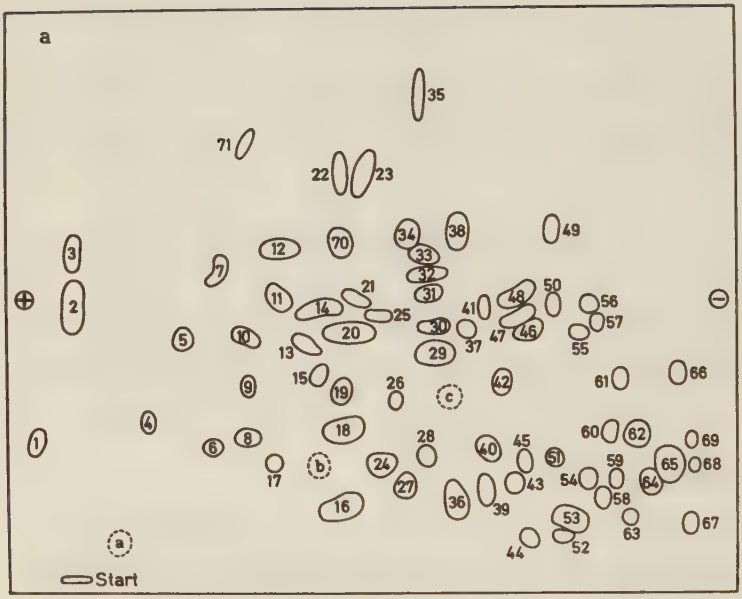


Abb. 19: Tryptischer "fingerprint" der PDH:
(a) schematisierte Darstellung der Peptide
(b) photographische Aufnahme; der starke Fleck rechts von der Auftragsstelle war in anderen Präparationen nicht vorhanden, er blieb daher unberücksichtigt.
Weitere Charakterisierung der Peptide s. Tab. V.

b

In Tabelle V sind die verschiedenen Verfahren zur Charakterisierung der Peptide nach speziellen Aminosäuren zusammengefaßt. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Vorstellung identischer Untereinheiten mit einem M_w = 73 000. Bemerkenswert erscheint, daß bei acht Tryptophan-Resten/73 000 g nur ein Tryptophan-Peptid gefunden wurde. Die Tryptophanfärbung wurde daher bei mehreren Präparaten wiederholt, das Ergebnis war stets das gleiche. Der Startfleck zeigte bei keinem der angewandten Verfahren eine Farbreaktion.

Oxydation der PDH führt zum Verschwinden der Peptide 10, 19, 30, während dafür an anderer Stelle drei neue Peptide a,b,c auftauchen (s. Abb. 19b).

Methode	Spezifität	Peptidzahl	Mol Aminosäurereste /73000g PDH	Peptidnummern
Ninhydrin	Lys-,Arg-Peptide	71	68	1-71
Ehrlich	Tryptophan	1	8	32
Sakaguchi	Arginin	29	33	2,3,5 13,14,18,22-25, 27,29,31,33,34,40,41, 42,46,47,51,52,53,56, 60,61,66,70
Tyrosin	Tyrosin	17	28	2,3,5,7,12,13,14,19,20, 24,30,36,38,39,40, 47,50

Tabelle V: Ergebnisse der verschiedenen Anfärbungen von "fingerprints" nach den bei Easley zusammengefassten Methoden. Die Peptidnummern entsprechen der in Abb. 19b vorgenommenen Nummerierung.

3.7 Bestimmung der terminalen Aminosäuren der PDH

3.71 COOH-terminale Studien:

In Gegenwart von Carboxypeptidase A + B wird die PDH rasch abgebaut. Nach 36 min. liegen 8% der Aminosäuren der PDH in freier Form vor. Tabelle VI gibt die Zeitabhängigkeit des Abbaus über 36 min. hinweg wieder. Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin und Cystein treten bis zu diesem Zeitpunkt nicht in signifikanten Mengen auf.

Aminosäure	0.5 min	5.5 min	11 min	30 min	36 min
	Mol / 73000 g PDH				
Lys	–[+)]	–	–	–	4.38
His	–	–	–	–	1.61
Arg	–	–	–	–	3.57
Asp	0.08	0.13	0.15	0.16	0.16
Thr[*)]	0.08	0.60	2.65	4.43	5.08
Ser[*)]	0.05	0.83	1.62	2.84	3.67
Glu	0.08	0.23	0.16	0.21	0.15
Pro	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Gly	0.13	<0.05	0.19	<0.05	0.26
Ala	1.07	3.68	7.66	10.53	10.86
Cys	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Val	0.18	2.81	4.12	6.69	7.06
Met	0.15	0.63	0.73	1.82	1.67
Ileu	<0.01	0.81	1.74	3.44	3.62
Leu	0.80	2.74	3.21	5.29	5.32
Tyr	0.16	2.27	3.98	6.30	6.70
Phe	<0.01	0.88	1.23	2.24	2.39

Tabelle VI: Abbau der PDH mit Carboxypeptidase A+B in 0.1 M Tris-Acetat-Puffer, pH 7.7, 0.5% Na-DS bei 25°C; die PDH war in Harnstoff denaturiert (s.Methoden).

*) Asparagin und Glutamin wurden bei den angewandten Analysebedingungen nicht hinreichend von Threonin und Serin getrennt, die für die letztgenannten Aminosäuren angegebenen Werte sind daher zu hoch.

+) Werte nicht bestimmt

Ein genauerer Einblick in die Kinetik des Abbaus konnte durch getrennte Einwirkung von Carboxypeptidase A bzw. Carboxypeptidase B auf die PDH gewonnen werden. Carboxypeptidase A spaltet in bemerkenswerten Mengen nur die Aminosäuren Alanin und Leucin ab, die auch beim gemeinsamen Abbau mit Carboxypeptidasen A + B als erste erscheinen. Andere Aminosäuren wurden nur in Spuren (< 0.2 Mol/73 000 g PDH) gefunden. Nachfolgende Behandlung mit Carboxypeptidase B lieferte als einzige basische Aminosäure Arginin; Lysin und Histidin erscheinen nur in verschwindenden Mengen.

Bei Behandlung der PDH nur mit Carboxypeptidase B wurde keine basische Aminosäure in nennenswerter Menge gefunden.

Parallelversuche mit nativer PDH führten zu vergleichbaren Resultaten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle VII zusammengestellt.

Aminosäure	1 min	5 min	60 min	30 min
	Mol / 73000 g PDH			
Ala	0.75	1.07	1.05	0
Leu	0.70	0.93	0.88	0
Lys	–+)	–	0.08	0.04
Arg	–	–	0.55	0.06

Tabelle VII: Abbau der PDH mit Carboxypeptidase A (1 Min.-, 5 Min.-Wert), anschließend Carboxypeptidase B (60 Min.-Wert) bzw. nur mit Carboxypeptidase B (30 Min.-Wert). Reaktionsbedingungen s. Legende zu Tabelle VI und Methoden.
Alle übrigen Aminosäuren waren - sofern überhaupt - in Mengen < 0.2 Mol/73 000 g PDH vorhanden.

+) Werte nicht bestimmt

Die Werte aus Tabelle VII berechtigen zu der Annahme eines COOH-Terminus mit der Sequenz - Arg - Leu - Ala - COOH. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Tabelle VI verliert die Hypothese von Alanin u n d Leucin als COOH-terminalen Aminosäuren sehr an Wahrscheinlichkeit, da in diesem Falle bei dem gezeigten raschen Abbau durch Carboxypeptidase A + B entweder Arginin in größerer Menge oder eine zweite basische Aminosäure zu erwarten wäre.

3.72 NH_2-terminale Studien

3.721 Carbamylierung nach Stark und Smyth: Der Versuch wurde mit 0.096 µMol (bezogen auf die PDH-Untereinheit = 73 000 g/Mol) in 8 M Harnstoff durchgeführt; parallel lief eine Kontrolle (0.050 µMol) ohne Kaliumcyanat. In Tabelle VIII sind die Ergebnisse der Aminosäurenanalysen und die Korrekturen nach Stark und Smyth wiedergegeben. Außer Serin (0.35 Mol/73 000 g) wurde keine andere saure oder neutrale Aminosäure in nennenswerter Menge erhalten;

Aminosäure	Testwert	Kontrollwert	Testwert minus Kontrollwert	korrigierter Wert
	Mol/73000 g PDH			
Asp	0.025	0.118	-0.093	–
Ser	0.113	0.043	0.070	0.35
Glu	0.133	0.767	-0.634	–
Gly	0.254	0.261	-0.007	–
Ala	0.071	0.056	0.015	0.015

Tabelle VIII: Ergebnisse einer Carbamylierung nach Stark und Smyth zur Bestimmung der NH_2-terminalen Aminosäure(n). Der hohe Gehalt an Glutaminsäure im Kontrollwert ist vermutlich auf unvollständige Abtrennung der Pyrrolidoncarbonsäure auf Dowex 50-X2 zurückzuführen.

Lysin und Histidin traten nur in Spuren auf, Arginin konnte nicht bestimmt werden (s. Methoden). Die im Nullwert gefundene beträchtliche Menge an Glutaminsäure resultiert wahrscheinlich aus einer unvollständigen Abtrennung der Pyrrolidoncarbonsäure auf Dowex 50-X2, was auf den relativ hohen Anteil an Glu im PDH-Molekül zurückgeführt werden kann.

3.722 Dansylierung: Außer Dansyl ε-Lysin wurde in allen Hydrolysaten von dansylierter PDH nur ein weiterer deutlich erkennbarer Fleck gefunden (s. Abb. 20, Pfeil), der orangefarben fluoreszierte, nahe beim Serin wanderte und mit keiner Testaminosäure in Übereinstimmung zu bringen war. Um die Möglichkeit eines nur unvollständig hydrolysierten Di- oder Tripeptids auszuschließen, wurde eine Probe des getesteten Gemischs weitere 48 Stunden hydrolysiert; dies führte zu keiner Veränderung in der Lage des nicht identifizierbaren Flecks.

3.723 Leucinaminopeptidase-Abbau: Nach Behandlung von nativer PDH mit Leucinaminopeptidase wurden keine freien Aminosäuren gefunden. Selbst nach 2 Stunden Inkubationszeit und in Gegenwart von 0.05% Na-DS betrug die Ausbeute an Serin als der quantitativ am stärksten vertretenen Aminosäure nur 0.09 Mol/73 000 g PDH.

Gute Ausbeuten wurden dagegen bei LAP-Behandlung einer PDH-Fraktion erzielt, die bereits sukzessiv mit Carboxy-

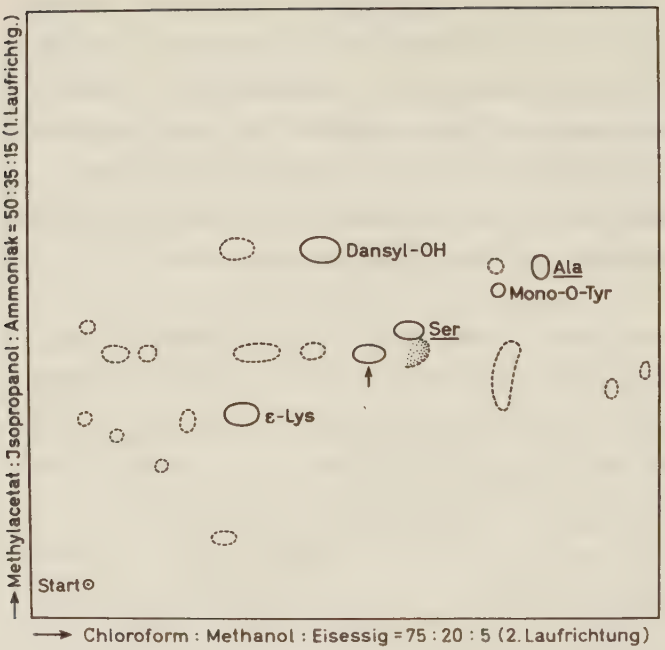


Abb. 20: Dünnschichtchromatogramm eines dansylierten PDH-Hydrolysats; als Vergleichssubstanzen liefen Dansyl-Ser und Dansyl-Ala in der Probe mit. Bei den schwachen Flecken handelt es sich um unspezifische Nebenprodukte, die ähnlich auch im Testaminosäurengemisch vorhanden waren. Der einzige markante Fleck (außer denen für ε-Lys und Mono-O-Tyr) befand sich in der Nähe von Ser (Pfeil).

peptidase A und B abgebaut war (Ala, Leu und Arg waren abgespalten). Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle IX veranschaulicht.

Bei der Interpretation des Ergebnisses ist zu berücksichtigen, daß die einzelnen Aminosäuren mit unterschiedlichen

Aminosäure	µM Aminosäure /73000g PDH	relative Hydrolyseraten der Aminosäureamide durch Leucinaminopeptidase
Lys	0.18	7
His	<0.05	-+)
Arg	<0.05	-
Asp	0.11	3
Thr	0.43	-
Ser	0.87	1
Glu	0.09	-
Pro	<0.05	0.7
Gly	0.35	0.1
Ala	0.40	3.5
Cys	<0.05	-
Val	0.32	17
Met	0.10	-
Ileu	0.10	20
Leu	0.13	100
Tyr	0.35	16
Phe	0.24	26

Tabelle IX: Leucinaminopeptidase-Abbau einer Carboxypeptidase-behandelten PDH (s. Text). Das Reaktionsgemisch wurde 100 min. bei 37°C ohne Na-DS inkubiert (s. auch Methoden). Die angegebenen Werte sind korrigiert um die Aminosäurenausbeuten eines Blindversuchs.
Die Hydrolyseraten der Aminosäureamide (nach E.L. Smith (51)) geben einen Anhaltspunkt für die Hydrolysegeschwindigkeiten der einzelnen Aminosäuren im Protein.

+) Werte in der zitierten Literaturstelle nicht angegeben.

Geschwindigkeiten abgebaut werden, so Ser-NH_2 mit 1% und Gly-NH_2 gar mit 0.1% der Hydrolyse-Geschwindigkeit von Leu-NH_2 (s. Tabelle IX).

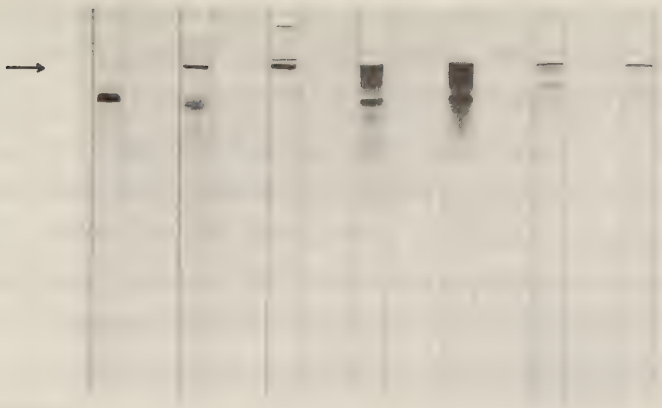
Da bei nicht mit Carboxypeptidase behandelter PDH keine Aminosäure in nennenswerter Menge durch Leucinaminopeptidase

abgetrennt wird, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß nach Carboxypeptidase-Behandlung der PDH (wobei, wie gezeigt, eine Kette attackiert wird) die durch Leucinaminopeptidase hydrolysierten Aminosäuren ebenfalls von nur einer Kette stammen. Die Befunde des Leucinaminopeptidase-Versuchs geben auch eine Erklärung für die sehr geringe Ausbeute an Ser nach Carbamylierung bzw. die Unmöglichkeit, Ser nach Dansylierung der PDH nachzuweisen. Bei dem nicht zu charakterisierenden Fleck (s. Abb. 20) handelt es sich möglicherweise um ein nicht hydrolysierbares kurzes Peptid, das u.a. Lysin und/oder Tyr enthalten kann, was die intensive Fluoreszenz dieser Komponente erklären würde.

3.8 Ergänzende Trennungsversuche:

Die bisher beschriebenen Ergebnisse enthielten keine erkennbaren Hinweise auf das Vorliegen nichtidentischer Ketten im PDH-Molekül. Dennoch ließen die nicht eindeutigen Bandenmuster bei Polyacrylamidgel-Elektrophorese des carboxymethylierten und des oxydierten Proteins weitere Studien mit variierten Elektrophoresebedingungen als notwendig erscheinen, um möglichst eine Klärung dieses unverstandenen Phänomens herbeizuführen.

Abb. 21 zeigt eine Serie von Elektrophoresen einer hochgereinigten PDH-Fraktion nach (1) Vorinkubation in 0.1 M 2-Mercaptoaethanol, 0.03% Na-DS, (2) Reduktion und



(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)

Abb. 21: Polyacrylamidgel-Elektrophorese einer hochgereinigten PDH-Fraktion unter verschiedenen Bedingungen:

a) 12.5% Acrylamid; Tris-Puffer-System, pH 6.8; 6 M Harnstoff, 0.03% Na-DS, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol;

b) 15% Acrylamid; Acetatpuffer-System, pH 4.8 (s. Methoden); Protein 4 Stunden bei 42°C 8 M Harnstoff, 0.03% Na-DS, pH 7.0, mit 1 Vol% 2-Mercaptoaethanol reduziert, anschliessend auf pH 4.0 eingestellt;

c) 15% Acrylamid; Tris-Boratpuffer-System, pH 9.5 (s. Methoden); Protein reduziert und carboxymethyliert;

d) 7.5% Acrylamid; Citratpuffer-System, pH 3.0 (s. Methoden); Protein oxydiert, ohne Na-DS;

e) 7.5% Acrylamid; Tris-Puffer-System, pH 6.8, 0.1% Na-DS; Protein mit 1% Na-DS, 1% 2-Mercaptoaethanol 3 Stunden bei 37°C inkubiert, gegen 0.1% Na-DS dialysiert;

f) 12% Acrylamid; Tris-Boratpuffer-System, pH 9.5; Protein oxydiert;

g) wie (f), aber Polyacrylamidgelsäule 8 Stunden bei 2 mA Stromstärke vorelektrophoriert, als Folge davon verschwindet die langsamer wandernde Bande.

Der Pfeil markiert die Oberfläche des Trenngels der einzelnen Säulen.

Carboxymethylierung und (3) Oxydation mit Perameisensäure bei verschiedenen Gelkonzentrationen, pH-Werten und vorelektrophoriertem bzw. unbehandeltem Gel.

Unter allen Bedingungen findet man eine Bande, die stärker ist als die übrigen. Allerdings erreichen die Nebenbanden bei pH 3.0 und 4.8 fast die Stärke der Hauptbande, während sie bei pH 6.8 wesentlich schwächer und bei pH 9.0 - 9.5 z.B. kaum mehr sichtbar sind.

Mitchell (37) hat für Clostridiopeptidase B gezeigt, daß sowohl das oxydierte als auch das reduzierte Protein unter dem Einfluß von Ammoniumperoxodisulfat, das nach Polymerisation im Gel zurückbleibt, in mehreren Banden wandert, die teilweise "schmieren". Der Persulfateffekt ist bei niederem pH größer, da einmal das Persulfat in der dem Protein entgegengesetzten Richtung wandert, zum anderen eine etwa vierfache Menge an Ammoniumperoxodisulfat zur Polymerisation des Gels erforderlich ist.

Die in Abb. 21 zusammengefassten Beobachtungen an PDH lassen sich in diesem Sinne interpretieren; besonders, da durch Vorelektrophorese der Gele bei pH 9.5 ein Teil der Nebenbanden zum Verschwinden gebracht werden konnte. Auch die zuletzt durchgeführten Elektrophoresen deuten nicht auf das Vorhandensein nichtidentischer Untereinheiten im PDH-Molekül. Es kann daher aufgrund der berichteten Versuche die Hypothese identischer Untereinheiten des PDH-Moleküls als wahrscheinlich angegeben werden.

4. Diskussion

Da proteinchemische Untersuchungen meist erst nach vorangegangener Denaturierung möglich sind, wobei häufig infolge neu zugänglicher, vornehmlich hydrophober Aminosäurereste die fortschreitende Denaturierung von zunehmender Unlöslichkeit des Proteins begleitet ist, besteht eine wesentliche Schwierigkeit solcher Untersuchungen darin, Lösungsmittelsysteme auszuwählen, die (1) - zumindest für bestimmte Fragestellungen - eine vollständige Dissoziation in Polypeptidketten gewährleisten, (2) das Protein in Lösung halten und (3) mit den jeweiligen Versuchsbedingungen (z.B. enzymatische Reaktionen in Gegenwart denaturierender Agentien) vereinbar sind.

Probleme vor allem dieser Art charakterisierten die Bearbeitung der molekularen Struktur der Pyruvatdehydrogenase, einer der Komponenten des Pyruvatdehydrogenasekomplexes aus E. coli K12. Besonders Wasserentzug wirkt sich nachteilig auf die Löslichkeitseigenschaften aus; lyophilisierte PDH ist auch in solvatisierenden Agentien wie Harnstoff, Na-DS, Brij, Cetyl-trimethyl-bromid nur schwer oder überhaupt nicht löslich. Behandlung mit Harnstoff oder mit 1% Na-DS führt zu sowohl in Polyacrylamid als auch der analytischen Ultrazentrifuge beobachtbarer Aggregatbildung, wodurch z.B. bestimmte Methoden und Bedingungen der Molekulargewichtsbestimmung ausgeschlossen, aber auch Polyacrylamidgelelektrophoresen

erschwert werden. Gute Löslichkeit wird dagegen im alkalischen Bereich > pH 8.5 beobachtet (s. auch Abb. 5b und tryptischer Abbau).

Eine Vielzahl von Versuchen in verschiedenen Richtungen führte schließlich zu einem in sich widerspruchslosen Bild:

Der PDH-Komplex läßt sich unter bestimmten Bedingungen elektrophoretisch in drei Komponenten auftrennen, die mit den von Reed et al. (17,31,32,49,63) charakterisierten Bestandteilen des Komplexes übereinstimmen.

Als Molekulargewicht für die PDH-Untereinheit in 6 M Guanidinium·HCl bei pH 2.0 wurde M_w = 73 000 ± 7 000 g/Mol bestimmt; dieser Wert wurde bei pH 7.4 für eine Proteinkonzentration bestätigt. Bei pH 5.9 dagegen ist die freie Diffusion der Moleküle, wohl infolge starker thermodynamischer Wechselwirkung, beträchtlich eingeschränkt, ein reales Molekulargewicht ist nicht bestimmbar.

Die Aminosäurenanalysen ergaben für die PDH-Untereinheit 35 Lysin- und 33 Argininreste, was angesichts des Molekulargewichts und zusammen mit ca. 70 tryptischen Peptiden (darunter 28 Arginin enthaltende Peptide) nur im Sinne identischer Untereinheiten interpretiert werden kann. C-terminale Studien führten zu einer Sequenz des Abbaus von - Arg - Leu - Ala - COOH, während als NH_2-terminale Aminosäure Serin nach Carbamylierung in geringer, nach Leucinaminopeptidaseabbau in der zu erwartenden Ausbeute erhalten wurde.

Schließlich erbrachten Elektrophoreseversuche in Polyacrylamid unter verschiedenen Bedingungen mit nativem, carboxymethyliertem und oxydiertem Protein keinen Hinweis auf nichtidentische Ketten, auch von DEAE-Cellulose und Sephadex G-200 in Gegenwart von 6 M Harnstoff, 0.1 M 2-Mercaptoaethanol wird die PDH in einer symmetrischen Bande eluiert.

Alle diese Befunde sprechen für identische Polypeptidketten im PDH-Molekül.

Die Struktur der PDH aus identischen Untereinheiten steht im Gegensatz zur Auffassung von Reed (43,44), wonach die PDH aus nichtidentischen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 45 000 aufgebaut sein soll. Experimentelle Einzelheiten, die seine Auffassung belegen würden, sind bisher nicht bekannt. Jedenfalls wurden wir dazu bewogen, bei der Beurteilung aller Ergebnisse diese Möglichkeit sorgsam zu prüfen. Nichtidentische Polypeptidketten im PDH-Molekül wären aufgrund der vorliegenden Aminosäurenanalysen und "fingerprints" nur bei einem Molekulargewicht des Monomeren von etwa der Hälfte des bestimmten möglich. Die Unauffindbarkeit sowohl einer zweiten COOH- als auch NH_2-terminalen Aminosäure ließe sich nur mit zusätzlichen Annahmen, die ausgerechnet auf je ein Kettenende zuzutreffen hätten, erklären, was zusammengenommen eher unwahrscheinlich ist. Auf das Fehlen von Anhaltspunkten für nichtidentische Ketten aus den Trennungsversuchen,

wobei besonders die Polyacrylamidgelelektrophoresen als empfindlich gelten können, wurde bereits hingewiesen. Die Peptidzahl bei gleicher Anzahl an Arginin- und Lysinresten würde wesentliche Unterschiede in der Primärstruktur nichtidentischer Polypeptidketten voraussetzen, die unter einem Teil der angewandten Bedingungen, wenn nicht in zwei distinkten Banden, so zumindest in einem bisymmetrischen Bandenmuster hätten sichtbar werden sollen.

Das in 0.05 M NaOH bestimmte Molekulargewichtsmittel von ca. 25 000 entspricht eindeutig einer infolge partieller Hydrolyse inhomogenen Fraktion, es kann daher nicht als repräsentativ für eine Untereinheit gelten.

Obwohl alle beschriebenen Beobachtungen für eine Zusammensetzung der PDH aus identischen Polypeptidketten sprechen, kann die Möglichkeit nichtidentischer Ketten durch diese Versuche nicht absolut ausgeschlossen werden. Der kritische Punkt der Beweisführung ist die Erfassung der kleinsten im Enzym vorliegenden molekularen Einheit. Von Elias und Bareiss (9) wurde auf die verschiedenen Möglichkeiten der Assoziation von Makromolekülen hingewiesen. Bei einer geschlossenen Assoziation z.B. kann "... die kritische Mizellkonzentration (Übergang: Multimeres → Monomeres) bei sehr niedrigen und meßtechnisch nicht mehr zugänglichen Konzentrationen ..." liegen. Die Molekülgröße des Monomeren wäre dann mit der angewandten Methode (Schlierenverfahren) nicht bestimmbar. Völlige

Klarheit würde erst eine Sequenzanalyse des Proteins erbringen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht erwogen werden konnte.

Die Frage nach der Struktur der PDH im Zusammenhang mit ihrer möglichen Beteiligung an der Regulation des Gesamtkomplexes kann mit dem charakterisierten Maß an Wahrscheinlichkeit als gelöst angesehen werden. Die im Proteinmolekül vorliegende Polypeptidkette wird von einem Cistron codiert, dessen Länge - entsprechend den Molekulargewichtsverhältnissen - etwa das Doppelte des LAT-Cistrons ausmachen sollte, was mit genetischen Experimenten im Einklang steht (22).

Der Beitrag dieser Arbeit zur Lösung des Regulationsproblems des PDHK wurde in der Einleitung bereits angedeutet. Ob und in welcher Weise das PDH-Molekül bzw. seine Untereinheit am Regulationsmechanismus direkt beteiligt ist, müssen Versuche über die Wechselwirkung zwischen PDH und dem wahrscheinlichen Effektor Pyruvat ergeben.

5. Zusammenfassung

1) Aufgabe und Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch proteinchemische Untersuchungen zu klären, ob sich die PDH-Komponente des PDH-Komplexes aus identischen oder nichtidentischen Untereinheiten zusammensetzt.

2) Das Enzym PDH wurde so weit angereichert, daß es anhand der verfügbaren Reinheitskriterien und entsprechend der Empfindlichkeit der geplanten Versuche als chemisch rein angesehen werden konnte.

3) Unter Bedingungen, die eine Aufspaltung in Monomere erwarten lassen, ergab sich als Molekulargewicht für die PDH-Untereinheit der Wert: M_w = 73 000 ± 7 000. Dies als Molekulargewicht des Monomeren bedingt zusammen mit 70 Lys- plus Arg-Resten/73 000 g und ca. 70 Peptiden nach tryptischem Abbau identische Polypeptidketten.

4) Als COOH-terminale Aminosäuresequenz wurde Arg - Leu - Ala - COOH, als NH_2-terminale Aminosäure Ser gefunden.

5) Versuche zur Trennung eventuell vorhandener nichtidentischer Polypeptidketten ergaben keinen Hinweis in dieser Richtung, zeigten jedoch eine extreme Aggregationsneigung der PDH-Untereinheit auf.

6. Literaturverzeichnis

1 Barman, T.E., and D.E. Koshland, jr.: J. Biol. Chem. (1967); 242, 5771

2 Brown, J.L., S. Koorajian, J. Katze, and I. Zabin: J. Biol. Chem. (1966); 241, 2826

3 Burstein, C., M. Cohn, A. Kepes et J. Monod: Biochim. Biophys. Acta (1965); 95, 634

4 Cohn, E.J., and J.T. Edsall: Proteins, Amino Acids and Peptides, New York: Reinhold (1943); 370

5 Crambach, A., R.A. Reisfeld, M. Wyckoff, and J. Zaccari: Anal. Biochem. (1967); 20, 151

6 Easley, C.W.: Biochim. Biophys. Acta (1965); 107, 386

7 Elias, H.-G.: Makromolekulare Chemie (1959); 29, 30

8 Elias, H.-G.: Ultrazentrifugen-Methoden, Beckman Instruments GmbH, München (1961), Seite 84 ff.

9 Elias, H.-G. und R. Bareiss: Chimia (1967); 21, 53

10 Englesberg, E., J. Irr, J. Power, and N. Lee: J. Bacteriol. (1965); 90, 946

11 Goedde, H.W., H. Inouye und H. Holzer: Biochim. Biophys. Acta (1961); 50, 41

12 Goldberger, R.F., and M.A. Berberich, in Organizational Biosynthesis, Edited by H.J. Vogel, J.O. Campen, Vernon Bryson; Acad. Press, New York and London (1967), 199 (p. 221)

13 Craven, G.R., E. Steers, jr., and C.B. Anfinsen: J. Biol. Chem. (1965); 240, 2468

14 Gray, W.R., in C.H.W. Hirs (Editor) Methods in Enzymology; Acad. Press, New York and London (1967); Vol XI, 139

15 Gunsalus, I.C., in W.D. McElroy and B. Glass (Editors): The Mechanism of Enzyme Action, Johns Hopkins Press, Baltimore (1954), p. 545

16 Hager, L.P., Ph.D. Dissertation, University of Illinois (1953)

17 Henney, H.R., jr., C.R. Willms, T. Muramatsu, B.B. Mukherjee, and L.J. Reed: J. Biol. Chem. (1967); 242, 898

18 Henning, U., C. Herz und K. Szolyvay: Z. Vererbungslehre (1964); 95, 236

19 Henning, U. und C. Herz: Z. Vererbungslehre (1964); 95, 260

20 Henning, U., G. Dennert, R. Hertel, and W.S. Shipp: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. (1966); Vol. XXXI, 227

21 Henning, U., J. Dietrich, K.N. Murray, and G. Deppe, in 4. Wissenschaftl. Konferenz der Gesellsch. Deutscher Naturforscher und Ärzte, Berlin (1967); Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1968), 223

22 Henning, U.: unveröffentlichte Resultate

23 Hirs, C.H.W.: J. Biol. Chem. (1956); 219, 611

24 Holzer, H., F. da Fonseca-Wollheim, G. Kohlhaw und C.W. Woenckhaus: Ann. N.Y.Ac.Sci. (1962); 98, 453

25 Itzhaki, R.F., and D.M. Gill: Anal. Biochem. (1964); 9, 401

26 Kaltschmidt, E.: persönl. Mitteilung

27 Katz, A.M., W.J. Dreyer, and C.B. Anfinsen: J. Biol. Chem. (1959); 234, 2897

28 Kawahara, K., and C. Tanford: J. Biol. Chem. (1966); 241, 3228

29 Kielley, W.W., and W.F. Harrington: Biochim. Biophys. Acta (1960); 41, 401

30 Klainer, S.M., and G. Kegeles: J. Phys. Chem. (1955); 59, 952

31 Koike, M., L.J. Reed, and W.R. Carroll: J. Biol. Chem. (1960); 235, 1924

32 Koike, M., L.J. Reed, and W.R. Carroll: J. Biol. Chem. (1963); 238, 30

33 Kostka, V., and F.H. Carpenter: J. Biol. Chem. (1964); 239, 1799

34 Krampitz, L.O., I. Suzuki, and G. Greull: Fed. Proc. (1961); 20, 971

35 Lodish, H.F., and N.D. Zinder: J. Mol. Biol. (1966); 19, 333

36 Massey, V., T. Hofmann, and G. Palmer: J. Biol. Chem. (1962); 237, 3820

37 Mitchell, W.M.: Biochim. Biophys. Acta (1967); 147, 171

38 Mukherjee, B.B., J. Matthews, D.L. Horney, and L.J. Reed: J. Biol. Chem. (1965); 240, PC 2268

39 Ornstein, L., and B.J. Davis: Disc Electrophoresis, Preprinted by Distillation Products Industries, Div. Eastman Kodac Co., Rochester, N.Y.

40 Reed, L.J., F.R. Leach, and M. Koike: J. Biol. Chem. (1958); 232, 123

41 Reed, L.J., and D.J. Cox, in P.D. Boyer (Editor): Ann. Rev. Biochem. (1966); Vol. 35, 57

42 Reed, L.J., in M. Florkin and E.H. Stotz (Editors): Comprehensive Biochemistry (1966); Vol. 14, p. 99

43 Reed, L.J., and R.M. Oliver: Brookhaven Symp. Biol. Nr. 21, in press

44 Reed, L.J., persönl. Mitteilung

45 Rutner, A.C., and M.D. Lane: Biochem. Biophys. Res. Comm. (1967); 28, 531

46 Schellenberger, A. und G. Hübner: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1967); 348, 491

47 Schellenberger, A., K. Wendler, P. Creutzburg und G. Hübner: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1967); 348, 501

48 Schellenberger, A., I. Heinroth und G. Hübner: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1967); 348, 506

49 Schwartz, E.R., and L.J. Reed: J. Biol. Chem. (1968); 243, 639

50 Seiler, N. und J. Wiechmann: Experientia (1964); XX, 559

51 Smith, E.L., in S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors): Methods in Enzymology; Acad. Press, New York (1955); Vol. II, p. 92

52 Somerville, R.L., and C. Yanofsky: J. Mol. Biol. (1965); 11, 747

53 Spackman, D.H., W.H. Stein, and S. Moore: Anal. Chem. (1958); 30, 1190

54 Stark, G.R., and D.G. Smyth: J. Biol. Chem. (1963); 238, 214

55 Steers, E., jr., G.R. Craven, and C.B. Anfinsen: J. Biol. Chem. (1965); 240, 2478

56 Sugiyama, T., and D. Nakada: Proc. Nat. Acad. Sci. (1967); 57, 1744

57 Svedberg, T. und K.O. Pedersen: "Die Ultrazentrifuge"; Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig (1940); "The Ultracentrifuge", Clarendon Press 1940. "The Ultrazentrifuge", photomech. Nachdruck, Johnson Reprint Co., New York 1960

58 Swingle, S.M., and A. Tiselius: Biochem. J. (1951); 48, 171

59 Truffa-Bachi, P., R. van Rapenbusch, J. Janin, C. Gros, and G.N. Cohen: European J. Biochem. (1969); 7, 401

60 Ullmann, A., M.E. Goldberg, D. Perrin, and J. Monod: Biochemistry (1968); 7, 261

61 Viñuela, E., M. Salas, and S. Ochoa: Proc. Nat. Acad. Sci. (1967); 57, 729

62 Warburg, O. und W. Christian: Biochem. Zeitschr. (1941); 310, 384

63 Willms, C.R., R.M. Oliver, H.R. Henney, jr., B.B. Mukherjee, and L.J. Reed: J. Biol. Chem. (1967); 242, 889

64 Willson, C., D. Perrin, M. Cohn, F. Jacob, and J. Monod: J. Mol. Biol. (1964); 8, 582

65 Yphantis, D.A.: Ann. N.Y. Ac. Sci. (1960); 88, 586

66 Yphantis, D.A.: Biochemistry (1964); 3, 297

7. Abkürzungen [+)]

ADH	=	Alkoholdehydrogenase
ace	=	Acetat-Locus in E. coli
COA	=	Carboxypeptidase A
COB	=	Carboxypeptidase B
DFP	=	Diisopropylfluorphosphat
DNase	=	Desoxyribonuclease
FAD	=	Flavinadenindinucleotid
KPP	=	Kaliumphosphatpuffer aus KH_2PO_4 und K_2HPO_4
LAP	=	Leucinaminopeptidase
LAT	=	Liponsäure-Acetyltransferase
LDH	=	Lipoamid-Dehydrogenase
Na-DS	=	Natriumdodecylsulfat
PDH	=	Pyruvat-Dehydrogenase
PDHK	=	Pyruvat-Dehydrogenasekomplex
TPP	=	Thiaminpyrophosphat

[+)] Die Abkürzungen für Aminosäuren und andere sehr gebräuchliche Abkürzungen wie CoA, NAD u.a. wurden nicht aufgeführt.

K O R R E K T U R E N

Seite 11, Abbildung 1: Ordinate 0,3 statt 0,1

Seite 36, Zeile 9 : 8(a) statt 8(b)

Lebenslauf

Am 4. Juni 1939 wurde ich als viertes Kind des Pfarrers Joh. Konrad Vogel und seiner Ehefrau Anne-Lene, geb. Hager, in Spachbrücken/Hessen geboren. Von 1946 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Westhofen/Rhh. und die altsprachlichen Gymnasien in Worms/Rh. und Darmstadt, an letzterem legte ich am 16. Februar 1959 die Reifeprüfung ab.

Nach einem landwirtschaftlichen Lehrjahr, zwölfmonatigem Grundwehrdienst und einem sieben Monate dauernden Forstpraktikum begann ich im WS 1961/62 mit dem Studium der Forstwirtschaft an der Universität Freiburg/Brsg., das ich im Herbst 1963 nach Ablegung des Vordiploms aufgab.

Vom WS 1962/63 bis WS 1965/66 studierte ich Biologie an den Universitäten in Freiburg/Brsg. (biologisches Vordiplom im Herbst 1964) und Köln. Unter meinen akademischen Lehrern hatten während dieser Zeit Prof. H. Mohr (Freiburg), Prof. W. Mencke (Köln) und Prof. L. Jaenicke (Köln) besonderen Einfluß auf meine wissenschaftliche Entwicklung.

Seit April 1966 arbeitete ich unter Anleitung von Prof. U.Henning am Institut für Genetik der Universität Köln, seit August 1966 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen an der vorliegenden Dissertation, die ich im Januar 1969 abschloß.